



TITLE:

アフリカツメガエルの原腸陥入運動の分子機構に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

後藤, 利保

CITATION:

後藤, 利保. アフリカツメガエルの原腸陥入運動の分子機構に関する研究. 京都大学, 2000, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2000-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3167139>

RIGHT:

アフリカツメガエルの原腸陥入運動の分子機構に関する研究

動物の初期発生において、原腸陥入は後の形態形成にとって重要な現象である。それはこの運動により胚の基本的な体制が出来上がり、組織が適正に配置されるようになるからである。現在までに組織分化の分子機構に関する報告は多いが、形態形成運動の分子機構に関するものは非常に少ない。そこで、形態形成運動を調節する遺伝子の相互作用を明らかにする目的で、原腸陥入運動のために重要な役割を果たす遺伝子の expression cloning を試みた。その結果、mRNA の過剰発現により著しく陥入を阻害する遺伝子 *champignon* (*cpg*) を単離した。*cpg* は N 末領域に POZ ドメイン、C 末領域に *krüppel* タイプの Zn finger ドメインをコードしている転写因子であった。*cpg* mRNA は maternal に存在し、その発現域は原腸胚期までは一様であるが、初期神経胚期から転写量が増大し、後期神経胚期以後では胚の前方領域、特にセメント腺近傍に局在することが確認された。

cpg mRNA の過剰発現胚では原口出現後の陥入が完全に止まり、神経胚期には原口が閉じないために、「マッシュルーム」様の形状になった。その後、胚は内胚葉を露出したまま背腹軸に沿って伸長した。*cpg* 過剰発現胚における組織切片、組織分化マーカー遺伝子の発現量、電子顕微鏡像、Keller sandwich と animal cap 外植体の伸長反応の解析により、*cpg* の過剰発現は組織分化に影響を与えず、原腸陥入運動の阻害は convergent extension 運動そのものが阻害されることによるものと考えられた。

cpg と GFP の融合蛋白質は後期胞胚から核内に移行するので、*cpg* は zygotic な転写因子として機能すると推測される。*fibronectin* のプロモーター領域を含むリポーター遺伝子の解析から、*cpg* が *fibronectin* の転写抑制因子として機能していることが分かった。さらに、*cpg* によって *Xenopus collagen type I alpha 1* が転写抑制される可能性も示唆された。しかし、両遺伝子はその発現パターンから原腸胚期の convergent extension 運動を制御しているとは考えにくい。以上の結果より、*cpg* または *cpg* と類似の転写因子が convergent extension 運動に直接的に関与する未知の遺伝子の転写抑制因子として働いていることが強く示唆される。

主論文

アフリカツメガエルの原腸陥入運動の
分子機構に関する研究

京都大学理学研究科

後藤利保

目次

序論	1
材料と方法	5
1. 卵と胚	
2. RNA の抽出	
3. cDNA ライブラリーの作成	
4. capping mRNA の合成と顕微注入	
5. <i>cpg</i> のクローニング	
6. <i>collagen type I alpha 1</i> のクローニング	
7. ノーザンハイブリダイゼーション	
8. シークエンス	
9. RT-PCR による定量解析	
10. Whole mount <i>in situ</i> hybridization	
11. 組織切片	
12. SEM 観察	
13. Keller sandwich experiment	
14. Animal cap assays	
15. <i>cpg</i> の各種コンストラクトの作成	
15-1. <i>cpg-GFP</i> 、15-2. <i>Form 1</i> 、15-3. <i>Form 2</i> 、15-4. <i>Form 3</i> 、	
15-5. <i>Form 4</i> 、15-6. <i>Form 5</i> 、15-7. <i>Form 6</i> 、15-8. <i>Form 7</i> 、	
15-9. <i>Form 8</i> 、15-10. <i>Form 9</i> 、15-11. <i>Form 10</i> 、15-12. <i>Form 11</i> 、	
15-13. <i>Form 12</i> 、15-14. <i>Form 10-GFP</i> 、15-15. <i>Form 11-GFP</i>	
16. ルシフェラーゼ活性の測定	
結果	14
1. <i>champignon(cpg)</i> の同定	
2. <i>cpg</i> の発現	

3. <i>cpg</i> による原腸陥入の阻害	
3-1. 原腸陥入阻害への <i>cpg</i> の濃度依存的効果	
3-2. 原腸陥入阻害への <i>cpg</i> の注入領域の特異性	
4. <i>cpg</i> 過剰発現胚の形態形成	
4-1. 切片観察	
4-2. RT-PCR	
4-3. SEM 観察	
4-4. convergent extension 運動の阻害	
4-5. <i>cpg</i> による既知の convergent extension 運動に関連する遺伝子への影響	
5. <i>cpg</i> の転写抑制因子としての働き	
5-1. <i>cpg</i> の核内移行	
5-2. 転写抑制因子としての <i>cpg</i> (1)	
5-2-1. アフリカツメガエル <i>collagen type I alpha 1</i> の同定	
5-2-2. <i>collagen type I alpha 1</i> の発現	
5-2-3. <i>cpg</i> による <i>collagen type I alpha 1</i> の転写抑制	
5-3. 転写抑制因子としての <i>cpg</i> (2)	
5-4. <i>cpg</i> の機能ドメイン解析	
5-4-1. Zn フィンガードドメインの機能	
5-4-2. POZ ドメインの機能	
5-4-3. その他の領域の役割	
5-4-4. 核内移行シグナルの機能	
考察	24
謝辞	32
引用文献	33
図と表	

序論

近年、分子生物学的手法の発達と共に、アフリカツメガエルの初期発生において組織分化に関わる多くの遺伝子が同定されてきており、それらの発見は発生メカニズムを理解する上で大きく貢献している。しかしながら、球形の卵が複雑な形状の個体に発生するには細胞の運動や配置換え、すなわち形態形成運動が必要である。実際に、組織分化においてシグナルを与える細胞と受け取る細胞が正確な位置に存在しなければ、たとえ組織分化が起こっても正常には発生しないことは明らかである。つまり、組織分化に関する理解を深めると共に、胚内での細胞の位置を決定するメカニズムがどのように制御されているのかを理解しなければならない。したがって、発生メカニズムを理解する上で胚の形態形成運動の研究は非常に重要である。アフリカツメガエルの初期発生における細胞レベルでの形態形成運動に関する知見は Keller 等によって詳細が報告されているが、実際に形態形成運動等を制御する分子はほとんど同定されていないと言っても過言ではない。

アフリカツメガエルの初期発生において、胚は胞胚中期までは同調的に分裂を繰り返すのみで、形状は球形のままである。その後、中期胞胚転移 (MBT) を境に、組織誘導に関わる zygotic mRNA が急激に転写され始める。この zygotic な転写を阻害すると原腸陥入運動が初期原腸胚期で停止するため、zygotic な転写が形態形成運動に必須である。原腸胚期になると原口から原腸の陥入が始まり、胚全体のダイナミックな形態変化が起こる。神経胚期以後には、前後軸に沿って胚は伸長し、神経管の形成等、組織分化と同調して胚のあらゆるところで複雑な形態形成運動が生じる。胚発生における様々な形態形成運動の中でも原腸陥入は最初の形態形成運動であり、これによって胚の形作りの大系が決まるという意味で最も重要な運動である。

原腸陥入運動は、ボトル細胞の形成、動物半球のエピボリー、卵割腔内壁に沿った咽頭内胚葉及び深層中胚葉の移動、帯域の (noninvoluting、involuting) 細

胞の convergent extension 運動の 4 つの要素によって説明される (Keller, 1980; Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Hardin and Keller, 1988; Keller and Tibbetts, 1989; Wilson and Keller, 1991; Keller and Jansa, 1992; Keller et al, 1992; Shih and Keller, 1992a, b)。ボトル細胞の形成は involution の方向を決定しているが、ボトル細胞を除去した胚においても、帯域細胞の involution 自体は抑制されない (Keller, 1981) ので involution の driving force を与えているわけではない。同様に動物半球のエピボリー、咽頭内胚葉及び中胚葉の移動に関しても、卵割腔を除去した胚でも陥入は阻害されない (Keller and Jansa, 1992) ので原腸陥入を引き起こす主要な要素では無いと考えられる。原腸胚の背側帯域の noninvoluting、involuting 細胞を取り出して、張り合わせた Keller sandwich は convergent extension 運動によって伸長し、正常な原腸陥入運動の帯域の運動を模倣する (Keller, 1991)。すなわち convergence が原口の直径を小さくする力となっており、extension が原腸を胚内部に陥入させる力を生じていると考えられる。したがって、原腸陥入運動の最も重要な要素は convergent extension 運動である。この convergent extension 運動は細胞レベルでは planar 方向及び vertical 方向の細胞の intercalation による方向性を持った細胞の配置換えによって起こると説明されている (Keller, 1980; Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Hardin and Keller, 1988; Keller and Tibbetts, 1989; Wilson and Keller, 1991; Keller and Jansa, 1992; Keller et al, 1992; Shih and Keller, 1992a, b)。

上述のように、細胞形態学的な原腸陥入運動の機構は Keller 等によって解明されてきているが、原腸陥入運動の分子機構に関する報告例は少ない。深層中胚葉の移動には卵割腔内壁上に存在する細胞外基質が必要であり、その主要な成分としては fibronectin が考えられている (Lee et al., 1984)。実際、fibronectin の機能を機能部位のポリペプチド断片や抗体で阻害すると、中胚葉の移動が妨げられる (Boucaut et al., 1984; Winklbauer, 1990; Ramos and DeSimone, 1996; Ramos et al., 1996; Winklbauer and Keller, 1996)。また、接着分子である *C-cadherin* (Lee and Gumbiner, 1995; Zhong et al., 1999)、*Xcadherin-11* (Hadeball et al., 1998)、*Paraxial protocadherin* (Kim et al., 1998) については、その mRNA の過剰発現により

convergent extension 運動が阻害される。C-cadherin については抗体による機能阻害によっても convergent extension 運動は阻害される (Lee and Gumbiner, 1995; Zhong et al., 1999)。このように原腸陥入運動に関わる分子としては細胞外基質や細胞接着分子が大きく関与していることが示唆されるが、現在までにアフリカツメガエルではコラーゲンやプロテオグリカンのような主要な細胞外基質の遺伝子等の同定は成されていない。さらに、それら細胞外基質や細胞接着分子の発現量を調整し、原腸陥入運動を調節していると考えられる転写因子等の報告もない。そこで、原腸陥入運動に関わる遺伝子発現の制御機構を明らかにする目的で本研究を行った。

まず、原腸陥入運動に影響を与える因子をとらえるために、expression cloning を行った。その結果、mRNA の過剰発現によって原腸陥入を著しく阻害する遺伝子 *champignon* (*cpg*) を単離した。*cpg* は POZ/Zn finger 蛋白質をコードしており、ホモロジー検索の結果、*cpg* はヒト (Widom et al., 1997) 及びマウス (Galera et al., 1994; Galera et al., 1996) の *c-krox* と高い相同性示し、アフリカツメガエルの *c-krox* family gene であると推測された。

cpg 過剰発現胚では原口の出現後、陥入が完全に止まり、神経胚期では「マッシュルーム」様の形状になった。その後、胚は原口が開いたまま D-V 軸に沿って伸長し、「にぎり寿司」様の形状となった。*cpg* 過剰発現胚における組織切片、マーカー遺伝子の発現量、電子顕微鏡像、Keller sandwich と animal cap 外植体の伸長反応の解析により、*cpg* による原腸陥入運動の阻害は直接 convergent extension 運動が阻害されることによるものと考えられた。

また、*cpg* と GFP の融合蛋白質は後期胞胚から核内に移行することが確認され、*cpg* が zygotic な転写因子として機能することが推測された。さらに *cpg* と高い相同性を示す哺乳類の *hc-krox* (Widom et al., 1997) は *Type I collagen*、*fibronectin* の転写抑制を行っていることから、*cpg* も同様にそれらのターゲット遺伝子 (*collagen type I alpha 1*、*fibronectin*) の転写抑制を行っていることが予測された。

そこで *cpg* の転写調節機構を調べるべく、*cpg* 過剰発現胚における *collagen type*

I alpha 1 の発現量を調べようと試みた。しかしながら、研究を始める段階でアフリカツメガエルの *collagen type I alpha 1* は単離されていなかったため、まずアフリカツメガエル *collagen type I alpha 1* のクローニングを行った上で研究を進めた。*collagen type I alpha 1* と *cpg* の mRNA の発現領域は後期神経以後は相補的であるが、原腸胚期での *collagen type I alpha 1* の転写産物は検出されなかったため、*collagen type I alpha 1* は原腸陥入運動に影響を及ぼす *cpg* のターゲット遺伝子ではないと考えられる。

アフリカツメガエルの *fibronectin* のプロモーター領域を含むリポーター遺伝子 (Gradl et al., 1999) の転写量は後期原腸胚期において *cpg* によって抑制されていた。しかしながら、*cpg* の過剰発現により陥入阻害された原腸胚の形態は *fibronectin* 機能阻害による形態異常とは異なり (Lee et al., 1984; DeSimone et al., 1992)、*fibronectin* も原腸陥入運動に影響を及ぼす *cpg* のターゲット遺伝子ではないと考えられる。今後、原腸胚期に *cpg* によって転写調節を受ける遺伝子及び、*cpg* と interact する分子を明らかにする必要がある。それらの研究を進める上で *cpg* の転写調節機構を深く理解する必要があるため、先の *fibronectin* のリポーター遺伝子を用いて *cpg* のディリーションコンストラクトの転写調節を調べた。その結果、*cpg* の POZ ドメインは転写抑制に寄与していること、機能上最も重要な核移行シグナルサイトの存在が明らかになった。

材料と実験方法

一般的な分子生物学的実験における反応条件等は、プロトコール集 (Sambrook et al., 1989) に従ったので詳しい記述を省略する。

1、卵と胚

卵はアフリカツメガエルの雌の背中の皮下にゴナトロピン（帝国臓器製薬）を注射し、ホルモン誘導をかけることにより得た。胚は卵を人工受精させ、スタインバーグ氏液中で飼育し、ゼリー層は 1.5% チオグリコール酸ナトリウム溶液により除去した。発生ステージは Nieuwkoop and Faber (1967) の発生段階表に基づき決定した。

2、RNA の抽出

全 RNA の抽出法として、cDNA ライブラリー作成に関しては CsTFA (Pharmacia) を用いた超遠心法 (Okayama et al., 1987)、northern hybridization、RT-PCR に関しては AGPC 法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) を用いた。

3、cDNA ライブラリーの作成

卵巣、卵母細胞、原腸胚期以前の各ステージの胚、外植体から抽出した全 RNA から polyAtract mRNA Isolation System (Promega) により mRNA を抽出し、ZAP-expression cDNA synthesis kit (Stratagene) を用いて 2 本鎖の cDNA を得た。cDNA は両サイトを EcoRI、XhoI で切断した pCS2+あるいは ZAP express vector に挿入した。pCS2+ vector ライブラリーは DNA 溶液の状態で、ZAP express vector ライブラリーはファージにパッケージング後、宿主菌溶菌液の状態で cDNA ライブラリーとして保存した。

4、capping mRNA の合成と顕微注入

全長 cDNA もしくは各種コンストラクトを挿入した CS2+を NotI で切断したものを鋳型とし、cap analog (STRATAGENE) と SP6 RNA ポリメラーゼにより capping mRNA を合成した。合成した mRNA は 100ng/ μ l に希釈し、割球あたり 2.5-10nl 顕微注入した。コントロールとして β -gal mRNA (1ng) を同様に顕微注入した。顕微注入に用いた針は直径 1mm 硝子管を PN-3 (NARISHIGE) を用いた二段引きによって作成し、SIGMACOTE (Sigma) によりシリコンコーティングしたものを使用した。なお針は注入直前にピンセットで針先を折って使用した。

5、cpg のクローニング

cDNA ライブラリー (プラスミド) を 1 プレートに約 100 クローン含まれるように、大腸菌 (XL-1Blue-MRF') に形質転換した。各プレート毎に全てのクローンを 15ml の LB 培地に回収し、37℃で 4 時間振盪培養した後、アルカリ SDS 法によってプラスミドを回収し、これを 1 プールとした。1 プール毎に回収したプラスミドから capping mRNA を合成した。合成した mRNA を 100ng/ μ l に希釈し、2 細胞期胚の両割球あるいは、4 細胞期胚の背側もしくは腹側 2 割球に 10nl (1ng) 顕微注入し、形態形成に異常を示したプールに対し同様の sib selection を行い、単一の原因遺伝子をコードするクローン *champignon* (Form 8) を得た。Form 8 は 3' 末端を欠いていたので、Form 8 から RI 標識プローブを作成し、卵巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、*champignon*(cpg)の全長 cDNA を得た。得られたクローン cpg (in ZAP express) から in vivo excision によって cpg (in pBK-CMV) を得た。cpg (in pBK-CMV) は SalI、XhoI 切断し、フラグメントを同酵素処理した pBSKII(+)へ挿入し cpg (in pBSKII(+)) を作成した。その後、cpg (in pBSKII(+)) を ClaI、XhoI で切断し、フラグメントを同酵素処理した pCS2+へ挿入し cpg (in pCS2+) を作成した。以後に用いられる過剰発現等の実験では cpg (in pCS2+) を用いて行った。

6、*collagen type I alpha 1* のクローニング

尾芽胚期 st.25 の胚から抽出された 1 μ g の全 RNA から Oligo (dT) プライマー、Superscript II (Gibco) を用いて、逆転写酵素反応により 1 本鎖 cDNA を得た。1/20 量の cDNA を鋳型とし、下記の縮重プライマーを用いて *collagen type I alpha 1* のフラグメントを得た。

forward 5'-AA(A/G)ATGTG(C/T)CA(C/T)TC(A/C/T)GA(C/T)TGGAA(A/G)-3',

reverse 5'-CAT(A/G)TA(A/G/T)GC(A/C/G/T)AC(A/G)CT(A/G)TT(C/T)TT(A/G)CA-3'。

得られたフラグメントから RI 標識プローブを作成し、卵巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、全長 cDNA を含むクローン *collagen type I alpha 1* (in ZAP express) を得た。得られたクローン *collagen type I alpha 1* (in ZAP express) から in vivo excision によって *collagen type I alpha 1* (in pBK-CMV) を得た。*collagen type I alpha 1* (in pBK-CMV) は SalI 切断後、平滑処理を行い、さらに XhoI 切断した後、フラグメントを StuI、XhoI で切断した pCS2+へ挿入し *collagen type I alpha 1* (in pCS2+) を得た。

7、ノーザンハイブリダイゼーション

卵巣から抽出した全 RNA から polyAtract mRNA Isolation System (Promega) により 10 μ g の mRNA を抽出し、1%のアガロース変成ゲルで電気泳動を行った。その後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、*cpg* (in pCS2+) の EcoRI、XhoI 切断によって得られた cDNA フラグメントから作成した RI 標識プローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。

8、シーケンス

得られたクローン、コンストラクト等のシーケンスは BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems)あるいは Fluorescent dye-labeled primer cycle sequencing kit (Amersham) を用いて PCR 反応を行い、その後 ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) あるいは ALFred DNA Sequencer (Pharmacia) によってシーケンスを決定した。

9、RT-PCR による定量解析

抽出された 1 μ g の全 RNA から Oligo (dT) プライマー、Superscript II (Gibco) を用いて、逆転写酵素反応により 1 本鎖 cDNA を得た。1/20 量の cDNA を鋳型とし、下記ののプライマーを用いた PCR 反応を行った。PCR 産物の 1/10 量を 2% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレンにトランスファーした。その後、各マーカー遺伝子のフラグメントから作成した RI 標識プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

RT-PCR に用いた各遺伝子のプライマー配列

cpg forward 5'-AAGCCTGGGCTACGAGACAT-3'

reverse 5'-TCATGGAGAGAGGCACATCG-3'

Histone4 forward 5'-CGGGATAACATTCAGGGTATCACT-3'

reverse 5'-ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT-3'

collagen type I alpha 1 forward 5'-ATTCAACGGACCCTCTGGAC-3'

reverse 5'-ATCTTCAGGTCACGGCAGGT-3'

Xbra (Genbank accession number: M77243) forward (nt 432-451), reverse (nt 733-714)

goosecoid (M81481) forward (nt 430-447), reverse (nt 917-900)

noggin (M98807) forward (nt 995-1012), reverse (nt 1275-1258)

Xwnt-8 (X57234) forward (nt 1126-1143), reverse (nt 1457-1440)

siamois (Z48606) forward (nt 539-560), reverse (nt 848-827)

N-CAM (M25696) forward (nt 2817-2834), reverse (nt 3159-3142)

Otx-2 (U19813) forward (nt 770-791), reverse (nt 1108-1087)

MyoD (X16106) forward (nt 221-240), reverse (nt 512-493)

GATA-2 (M76564) forward (nt 982-1001), reverse (nt 1400-1381)

C-cadherin (U04707) forward (nt 1372-1391), reverse (nt 1814-1795)

PAPC (AF042192) forward (nt 2490-2509), reverse (nt 2955-2936)

fibronectin (M77820) forward (nt 7144-7163), reverse (nt 7543-7524)

1 0、Whole mount *in situ* hybridization

Whole mount *in situ* hybridization は Harland (1991) の方法により行った。cpg (in pCS2+)、collagen type I alpha 1 (in pCS2+) とともに EcoRI で切断後、これらのフラグメントを鋳型にし、T7 RNA ポリメラーゼによって digoxigenin-labeled RNA probe を作成した。検出には基質として alkaline phosphatase substrate (NBT) (Boehringer Mannheim) を使用した。

1 1、組織切片

胚を 2% グルタルアルデヒド (0.1M PBS : pH 7.5) で一晩固定し、エタノールによる脱水、キシレンでの置換を経て、Paraplast Plus (Sigma) に包埋した。マイクロトームにより厚さ 10 μ m の連続切片を作成し、キシレン、含水エタノールにより段階的に水性に置換した後、0.1% azocarmine B で 20 秒、0.2% aniline blue、0.4% orange G 混液で 7 分間染色した。Whole mount *in situ* hybridization 後の切片作成では、メタノール中の発色後の胚をキシレン置換後、同様に Paraplast Plus (Sigma) に包埋し、厚さ 10 μ m の連続切片を作成した。

1 2、SEM 観察

胚を 2% グルタルアルデヒド (0.1M PBS : pH 7.5) で一晩固定し、剃刀刃で胚の中央部で 2 分し、1% OsO₄ (0.1M PBS : pH 7.5) で後固定した。その後、アセトンにより段階的に脱水した後、液体二酸化炭素により臨界点乾燥を行い、走査型電子顕微鏡 (JSM-5800LV) で観察した。

1 3、Keller sandwich experiment

2 細胞期胚の両割球の帯域に cpg mRNA (1ng) を顕微注入した胚と正常胚を原腸胚初期 st.10 まで飼育し、Keller (1991) の方法により外植体を得た。その後、対照胚が神経胚期 st.20 に達した時期に外植体の伸長の様子を観察した。

1 4、Animal cap assays

2細胞期胚の両割球の動物極に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入した胚と正常胚を胞胚期 st.8 まで飼育し、animal caps を切り出した。10ng/ml human recombinant activin A を含む LCMR 溶液中で 6 時間 activin 処理を行った (Stewart and Gerhart, 1990)。その後、対照胚が神経胚期 st.20 に達した時期に外植体の伸長の様子を観察し、一部の外植体は RT-PCR により、分化マーカーの定量解析を行った。

1 5、*cpg* の各種コンストラクトの作成

15-1、*cpg-GFP*

cpg (in pCS2+) を鋳型に下記のプライマーを用いて KOD DNA polymerase (TOYOBO) による PCR フラグメントを得た。得られたフラグメントを EcoRI、XbaI で切断し、同酵素で処理した pCS2mt-UGP に挿入し *cpg-GFP* を得た。
GFP-UP 5'-CTTGAATTCCCAGGTGAAGATGGCAAGCTC-3'
GFP-DOWN 5'-CATTCTAGATGAAGCGTCCAAAACCCCCTC-3'。

15-2、*Form 1*

cpg (in pBK-CMV) を ScaI 切断後、自己ライゲーションした。その後 SalI、XbaI 切断し、同酵素で処理した pBSKII(+)に挿入した。その後、XbaI、XhoI で切断し、同酵素で処理した pCS2+へ挿入して *Form 1* を得た。

15-3、*Form 2*

cpg (in pCS2+) を EcoRI、XhoI 切断し、フラグメントを同酵素で処理した pCS2+へ挿入した。その後、PstI 切断し、最も大きなフラグメント (713 bp) のみを再度挿入して *Form 2* を得た。

15-4、*Form 3*

cpg (in pCS2+) を SacII s で切断後、平滑処理を行った。SacII 切断後、平滑処理を行い、さらに XhoI 切断した後、フラグメントを StuI、XhoI で切断した pCS2+へ挿入し *Form 3* を得た。

15-5、Form 4

cpg (in pBK-CMV) を *ScaI* 切断後、フラグメントを同酵素で処理した pBK-CMV に挿入した。その後 *XhoI* 切断し、フラグメントを同酵素で処理した pCS2+に挿入して *Form 4* を得た。

15-6、Form 5

Form 4 を *PstI* 切断し、フラグメント (121 bp) を再度挿入して *Form 5* を得た。

15-7、Form 6

cpg (in pCS2+) を *EcoRI*、*XhoI* 切断し、同酵素で処理した pBSKII(+)へ挿入した。そして *AatII* で切断後、平滑処理し、*XhoI* 切断で得られたフラグメントを *StuI*、*XhoI* で切断した pCS2+へ挿入し *Form 6* を得た。

15-8、Form 7

Form 6 を *PstI* 切断し、フラグメント (121 bp) を再度挿入して *Form 7* を得た。

15-9、Form 8

expression cloning により最初に得られたクローンを用いた。

15-10、Form 9

cpg (in pCS2+) を *EcoRI*、*XhoI* 切断し、同酵素で処理した pBSKII(+)へ挿入した。そして *AatII* で切断後、平滑処理し、*EcoRI* 切断した cDNA フラグメントとベクター断片を得た。cDNA フラグメントはさらに *ScaI* で切断し、フラグメント (562 bp) を先のベクター断片に挿入して *Form 9* を得た。

15-11、Form 10

cpg (in pCS2+) を *EcoRI*、*XhoI* 切断し、同酵素で処理した pBSKII(+)へ挿入した。そして *AatII* で切断後、平滑処理したベクター断片を作成した。一方下記の

プライマーを用いて、*cpg* (in pCS2+) を鋳型に PCR により増幅されたフラグメントをベクター断片に挿入した。その後 *EcoRI*、*XbaI* で切断し、フラグメントを同酵素で処理した pCS2+へ挿入して *Form 10* を得た。

UP 5'-TCTCAGCTGCCCCAGGAATGTCCCGTCTGTC- 3'

DOWN 5'- CATTCTAGATGAAGCGTCCAAAACCCCCTC-3'。

15-12、*Form 11*

下記のプライマーを用いて、*Form 9* を鋳型に PCR により増幅されたフラグメントを *EcoRI*、*XhoI* で切断し、フラグメントを同酵素で処理した pCS2+へ挿入して *Form 11* を得た。

UP 5'- CTTGAATTCCCAGGTGAAGATGGCAAGCTC- 3'

DOWN 5'- TTTCTCGAGCTACTCGAAGGGCCGGTCGCC-3'。

15-13、*Form 12*

Form 9 を *PstI* 切断し、平滑処理後、*XhoI* 切断によりベクター断片を得た。一方下記のプライマーを用いて、*cpg* (in pCS2+) を鋳型に PCR により増幅されたフラグメントを *BamHI* で切断し、平滑処理した。その後 *XhoI* で切断したフラグメントを先のベクター断片に挿入して *Form 12* を得た。

15-14、*Form 10-GFP*

Form 10 を鋳型に下記のプライマーによる PCR によって増幅されたフラグメントを *EcoRI*、*XbaI* で切断し、同酵素で処理した pCS2mt-UGP に挿入し *Form 10-GFP* を得た。

UP 5'-CTTGAATTCCCAGGTGAAGATGGCAAGCTC-3'

DOWN 5'-CATTCTAGATGAAGCGTCCAAAACCCCCTC-3'。

15-15、*Form 11-GFP*

Form 11 を鋳型に下記のプライマーによる PCR によって増幅されたフラグメントを *EcoRI*、*XbaI* で切断し、同酵素で処理した pCS2mt-UGP に挿入し *Form 11-*

GFP を得た。

UP 5'-CTTGAATTCCCAGGTGAAGATGGCAAGCTC-3'

DOWN 5'- CATTCTAGACTCGAAGGGCCGGTC-3'。

16、ルシフェラーゼ活性の測定

cpg、もしくは各種コンストラクトから合成した mRNA (1ng) とアフリカツメガエルの *fibronectin* のプロモーター領域 (-3403-+20) を上流に有するルシフェラーゼリポーター遺伝子 (Gradl et al., 1999) (25pg) を 2 細胞期胚の両割球の帯域に顕微注入し、原腸胚後期 st.12 に 5 個の胚を Reporter Lysis Buffer

(Promega) 150 μ l にピペッティングで溶解した。溶解液を 4 $^{\circ}$ C、12000rpm で 2 分間遠心し、上清の 100 μ l を分取した後、さらに 400 μ l の Reporter Lysis Buffer を加えて容量を 500 μ l にした。この胚抽出液を一度-85 $^{\circ}$ C で凍らせてから融解後、Luciferase Assay Buffer (Promega) を 50 μ l 加えて、直ちにルミノスキャン TL (大日本製薬) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

結果

1、*champignon*(*cpg*)の同定

胞胚期 st.7 の cDNA ライブラリーから合成した mRNA を 2 細胞期の両割球に顕微注入し、expression cloning によって、原腸陥入を阻害する遺伝子 *cpg* を単離した。*cpg* は全長約 2.4k bp (図 1) で 470 アミノ残基をコードしていた (図 2)。*cpg* は N 末領域に POZ ドメイン (図 3) と C 末領域に *krüppel* 様の C₂H₂ タイプの Zn フィンガードメインを 3 つ有していた。PSORT (Nakai and Horton, 1999) の解析によって、*cpg* は 3 箇所の核内移行シグナルを有することが予測された (図 2)。BLAST によるホモロジー検索によって、*cpg* は C₂H₂ タイプの転写因子であるヒト *c-krox* (*hc-krox*; Widom et al., 1997)、マウス *c-krox* (*mc-krox*; Galera et al., 1994) と比較的高い相同性を示した。*hc-krox* は完全な POZ ドメインと 3 つの Zn フィンガードメインを有するが、*mc-krox* は POZ ドメインの N 末端領域を欠いている。POZ ドメインに関して *cpg* は *hc-krox* と 63.5% の相同性を示し (図 4)、Zn フィンガードメインに関しては *hc-krox*、*mc-krox* と共に 93.5% と高い相同性を示した (図 4、5)。しかしながら、*cpg* における POZ ドメインと Zn フィンガードメインの間に挟まれた領域は *hc-krox*、*mc-krox* よりも 30 アミノ残基短く、また相同性は低かったので、*cpg* は *c-krox* の *Xenopus* ホモログではなく、*c-krox* ファミリー遺伝子の一つであると判断した。Zn フィンガードメインに関して、*cpg* は他の *krüppel* 様の転写因子、ヒト AMP-1 やマウス LRF とも高い相同性を示したが、その他の領域での相同性は低かった (図 5)。

2、*cpg* の発現

cpg の mRNA は maternal に存在しており、胞胚中期までは徐々にその発現量は減少していったが、初期神経胚期 (st. 15) 以後、zygotic な発現は顕著に増していった (図 6)。原腸胚後期までは *cpg* の発現量が低く、whole mount *in situ* hibridization では発現が確認されなかった (data not shown) ので、胞胚期 st.8、原腸胚期 st.10 における動植軸、背腹軸に対する空間的発現量を RT-PCR によって解析した。

その結果、いずれの領域間でも発現量に有為な差は確認されず、*cpg* がこの時期に一様に発現していることが分かった（図 7）。whole mount *in situ* hybridization によって、神経胚期以後で *cpg* は胚の前方領域、特にセメント腺に局在することが分かった（図 8）。

3、*cpg* による原腸陥入の阻害

2細胞期胚の両割球側方帯域に *cpg* mRNA（1ng）を顕微注入し、植物極側を time-lapse ビデオカメラで撮影した。その結果、*cpg* mRNA を顕微注入した胚では原腸胚初期に原口は正常な時間と位置に出現し、大きな卵黄栓を形成することが明らかになった（data not shown）。しかし、ほとんどの場合、その後は原口は閉じていかず（図 9E）、逆に原口の側部領域は消失した（図 9E、11B）。そして、神経胚期には最も影響が強く現れた胚は「マッシュルーム」様の形状となった（図 9E、11C）。この形状より、原因遺伝子を *champignon* (*cpg*) と命名した。尾芽胚期までに当初の背腹軸に沿って胚は伸長し、露出した状態の内胚葉とそれを覆う外胚葉の2層からなる「にぎり寿司」の様な形状となった（図 9F）。

3-1、原腸陥入阻害への *cpg* の濃度依存的効果

cpg による原腸陥入阻害効果は濃度依存的であり、低い濃度（250pg）の mRNA の顕微注入では僅かに原腸陥入が阻害されるだけであり（図 9C）、原口は閉じないが、頭部領域を形成する胚が多く出現した（図 9D、表 1）。

3-2、原腸陥入阻害への *cpg* の注入領域の特異性

cpg による原腸陥入阻害効果は *cpg* を顕微注入する領域によって異なり、動物極や植物極への注入では阻害効果は低く、帯域への注入が最も阻害効果が強いことが分かった（表 2）。また、4細胞期胚の背側2割球帯域に顕微注入した胚は陥入阻害効果が強く、2細胞期の両割球側方帯域に注入した場合と同様の形質が見られた（図 10A、B）。しかし、4細胞期胚の腹側2割球帯域への注入では

腹側の陥入のみが阻害され、背側の陥入は正常なため、前方部は正常な胚に発生した（図 10C、D）。このように *cpg* による原腸陥入阻害効果は注入領域に依存的であった。

4、*cpg* 過剰発現胚の形態形成

4-1、切片観察

cpg mRNA を過剰発現した胚の細胞分裂、細胞増殖は胚細胞の数と形態から影響は受けていないと考えられた（図 11）。また、卵黄栓の形成までは正常に発生は進み、初期の原腸陥入は起こるが、その後の陥入は起こらなかった（図 11B）。咽頭内胚葉（図 11B）及び深層中胚葉（図 11C）の動物極方向への移動は確認できた。神経胚期に卵割腔の空間は植物半球の卵黄細胞塊に分散していき、卵黄細胞塊に多くの隙間が確認できた（図 11C）。原腸陥入が完全に阻害された *cpg* 過剰発現胚においても神経管、脊索、体節組織の構造が確認され（図 11D）、形状は正常ではないものの組織は分化していることが分かった。

4-2、RT-PCR

原腸陥入が完全に阻害されている *cpg* 過剰発現胚においても神経や中胚葉組織の分化は起こっていたことを既に切片観察により示したが、これはさらに RT-PCR によるマーカー遺伝子の発現を解析することでも確認された。原腸胚期 st.11 において初期中胚葉マーカー遺伝子 (*Xbra*, *gooseoid*, *noggin*, *Xwnt-8*)、内中胚葉マーカー遺伝子 (*siamois*) は *cpg* 過剰発現胚においても対照胚とそれらの発現量変わらなかった（図 12A）。また、神経胚期 st.23 において神経マーカー遺伝子 (*N-CAM* and *Otx-2*)、後期中胚葉マーカー遺伝子 (*MyoD* and *GATA-2*) も *cpg* によって影響を受けなかった（図 12B）。これらの結果は *cpg* による原腸陥入運動の阻害が組織分化（特に中胚葉）の抑制の結果ではないことを示している。

4-3、SEM 観察

原腸胚期に *cpg* 過剰発現胚の SEM 観察によって原腸陥入の微細構造を観察した。その結果、*cpg* 過剰発現胚の側部表層付近の細胞層は薄い、動物極付近の細胞層は厚いままであることが分かった（図 11B、13A、B）。このように原腸胚期に動物半球のエピボリーが阻害されていたが、神経胚期以後では動物半球の細胞層も薄くなっていることが分かった（図 11C）。咽頭内胚葉及び中胚葉の動物極方向への移動は確認されたが、正常な原腸胚の形態とは異なっていた（図 13B）。内胚葉は隙間が多く目立ち、卵割腔の液が内胚葉細胞の隙間に移動していることが再確認された（図 13C）。ボトル細胞の形成は時期、形状ともに正常であることが分かった（図 13D）。以上の結果から、*cpg* 過剰発現胚では初期のエピボリーによる伸展が阻害されており、咽頭内胚葉及び中胚葉の移動、ボトル細胞の形成は大きく影響を受けていないことが確認された。そこで、次にもう一つの要素である convergent extension 運動を調べた。

4-4、convergent extension 運動の阻害

Keller サンドウィッチ塊は自立的に convergent extension 運動を行い、伸長反応を示すことが知られている（Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988）ので、*cpg* 過剰発現胚から作成した Keller サンドウィッチ塊の伸長反応を調べた。その結果、*cpg* mRNA の過剰発現によって Keller サンドウィッチ塊の伸長は著しく阻害された（図 14）。また、高濃度の activin で処理した animal cap は convergent extension 運動を模倣して、伸長反応することが知られている（Symes and Smith, 1987; Symes et al., 1994）ので、*cpg* 過剰発現胚で animal cap assays を行った。その結果、正常胚の animal cap は activin によって伸長する（図 15A）のに対し、*cpg* は activin による伸長作用をほぼ完全に阻害した（図 15B）。また、animal cap 外植体は activin の濃度依存的に様々な組織に分化することが知られている（Symes and Smith, 1987; Symes et al., 1994）が、*cpg* による伸長反応の阻害は組織分化に影響しない。これは animal cap の RT-PCR によって中胚葉マーカー遺伝子（*noggin*, *MyoD* and *Xbra*）の発現に影響が無いことにより確認された（図 16）。activin 処理を行わない場合、*cpg* の過剰発現だけでは animal cap は正常胚と同様に伸長せず球形の

細胞塊になり、各種の組織分化も確認できなかった（図 15C、D、16）。これらの結果は *cpg* が初期の epiboly 運動に加えて、convergent extension 運動そのものも阻害していることを示す。

4-5、*cpg* による既知の convergent extension 運動に関連する遺伝子への影響

cpg が convergent extension 運動を阻害することが分かったが、現在までに、mRNA の過剰発現によって convergent extension 運動を阻害する働きのある遺伝子として *C-cadherin*（Lee and Gumbiner, 1995; Zhong et al., 1999）や *PAPC*（Kim et al., 1998）が報告されている。そこで、*cpg* がこれらの遺伝子を介して convergent extension 運動を阻害している可能性を調べるために、原腸胚期の *cpg* 過剰発現胚において RT-PCR を行った。その結果、*C-cadherin*、*PAPC* の発現は共に *cpg* による影響を受けていなかった（図 17）。

5、*cpg* の転写抑制因子としての働き

5-1、*cpg* の核内移行

結果 1 で示したように、*cpg* は POZ/Zn フィンガー蛋白質をコードしており、また推測される 3 箇所の核内移行シグナルが存在するので、転写因子として機能することが予測される。そこでまず、*cpg* と *GFP* の融合 mRNA (*cpg-GFP*) を作成し、その蛋白質が核内に移行するかを調べた。*cpg-GFP* mRNA (1ng) を 2 細胞期の両割球側方帯域に顕微注入した結果、胞胚中期までは *GFP* による蛍光シグナルが細胞質中に存在している（図 18A、B）が、胞胚後期以後は蛍光シグナルが核内に移行することが分かった（図 18C、D）。したがって *cpg* が zygotic な転写因子として機能する可能性が示唆された。

5-2、転写抑制因子としての *cpg* (1)

cpg と相同性の高かったヒト *hc-krox* は collagen type I alpha 1 (*COL1A1*) と fibronectin の転写を抑制することが知られている（Widom et al., 1997）。したがって、*cpg* も同様にこれらの遺伝子の発現抑制を行っている可能性がある。そこ

で、*cpg* 過剰発現胚でのこれら 2 つの遺伝子の発現を調べることにした。
しかし、現在までに *fibronectin* 遺伝子は既にアフリカツメガエルで報告されているが、*collagen type I alpha 1* 遺伝子に関しては報告されておらず、研究を進める上でアフリカツメガエルにおいて *collagen type I alpha 1* を単離する必要に迫られた。そこで、まずアフリカツメガエルにおける *collagen type I alpha 1* を同定する実験を行った。

5-2-1、アフリカツメガエル *collagen type I alpha 1* の同定

既知の脊椎動物の *collagen type I alpha 1* (Asahina *et al.*, 1999a, b; Li *et al.*, 1995) のアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを作成し、st.25 の胚から RT-PCR によって *collagen type I alpha 1* のフラグメントを得た。このフラグメントをプローブに卵巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングによってアフリカツメガエル *collagen type I alpha 1* の全長 cDNA を得た。*collagen type I alpha 1* は約 5.7k bp で 1447 アミノ残基をコードしていた (図 19)。アフリカツメガエル *collagen type I alpha 1* も既知の *collagen type I alpha 1* と同様にプロリンとグリシンを多く含んでいた。BLAST によるホモロジー検索によって、アフリカツメガエル *collagen type I alpha 1* はウシガエル (*Rana catesbeiana*)、イモリ (*Cynops pyrrhogaster*)、ニワトリ、ヒト、マウスの *collagen type I alpha 1* と高い相同性を示し (図 20)、ウシガエルと 88.1%、イモリと 85.0%、ニワトリと 83.7%、ヒトと 81.7%、マウスと 80.6% のアミノ酸残基で一致していた。

5-2-2、*collagen type I alpha 1* の発現

RT-PCR によって、*collagen type I alpha 1* の転写産物の量は神経管が閉じた後に急激に増加することが分かった (図 21)。whole mount *in situ* hybridization によって st.25 の背側後方領域に初めて発現が認められた (図 22A)。その後、発現領域は前方部に広がり (図 22B)、st.30 には頭部領域での発現が認められるようになった (図 22C)。尾芽胚 (st.30) の切片 (横断面) によって、*collagen type I alpha 1* は主に尾部から胴体部の背側表皮の内層に強く発現し、背側表皮の外層や真皮

節にも発現していることが分かった（図 22E、G）。また、頭部領域では背側だけでなく腹側の表皮内層にも発現していた（図 22D、F）。さらに胚を前方と後方に 2 分し、それぞれの領域での *collagen type I alpha 1* の発現量を RT-PCR によって調べた結果、胚の後方部ではまだ体節化が起こっていない st.20 でも既に後方での発現量が多いことが認められ、その傾向は st.30 まで続いていた（図 23）。

5-2-3、*cpg* による *collagen type I alpha 1* の転写抑制

神経胚期（st. 20）以後に初めて *collagen type I alpha 1* の発現が検出され（図 21）、また *collagen type I alpha 1* と *cpg* を共に顕微注入しても *cpg* による原腸陥入阻害のレスキューはされなかった（data not shown）ので、*cpg* による原腸陥入阻害に *collagen type I alpha 1* は関与していないと考えられる。しかし、*collagen type I alpha 1* の転写因子である *hc-krox*、*mc-krox* の Zn フィンガードメインは非常に高い相同性（図 5）が確認された。また、*collagen type I alpha 1* の発現は胚の後方領域から始まり、徐々に胚の前方部へと発現領域が広がって行ったが、胚の前方で確認された *cpg* の発現領域（図 8C、D）と相補的であったので、発生後期では *cpg* が *collagen type I alpha 1* の抑制に関与していることが強く示唆される。

5-3、転写抑制因子としての *cpg* (2)

結果 5-2 で *cpg* が *collagen type I alpha 1* の転写抑制因子である可能性を示したが、*cpg* は *fibronectin* の発現に関しても転写抑制因子として機能する可能性もある。しかし、アフリカツメガエルの発生では *fibronectin* の母性の mRNA 量は非常に多く、さらに zygotic な発現は原腸胚期 st.12 以後に始まる（Lee et al., 1984; DeSimone et al., 1992）ことから、*fibronectin* は原腸陥入運動に影響を及ぼす *cpg* のターゲット遺伝子ではないことは明らかである。実際に *cpg* mRNA (1ng) を 2 細胞期胚の両割球側方帯域に過剰発現させたが、原腸胚期中期 st.11 での *fibronectin* の発現量は変化しなかった（図 24）。しかし、アフリカツメガエルの *fibronectin* に関してはプロモーター領域の報告（Gradl et al., 1999）があったので、そのプロモーター領域を用いたルシフェラーゼリポーター遺伝子を利用し、*cpg*

による転写調節を調べた。*cpg* mRNA (1ng) を過剰発現させた胚を用いて、*fibronectin* の zygotic な転写の始まる st.12 においてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、*cpg* が *fibronectin* リポーター遺伝子の転写を抑制していることが分かり (図 25)、原腸胚後期 st.12 以後に *cpg* が *fibronectin* の転写抑制因子として機能している可能性が示唆された。

5-4、*cpg* の機能ドメイン解析

cpg が原腸陥入運動をどのように制御しているかを調べるためには今後、原腸胚期に特異的な *cpg* のターゲット遺伝子を単離する必要がある。その研究を進める上で *cpg* の転写調節機構を深く理解しなければならない。そこで上述のように *cpg* によって転写が抑制された *fibronectin* プロモーター領域を含むルシフェラーゼリポーター遺伝子を用いて、*cpg* のディリーションコンストラクトの転写調節を調べた (図 26)。

5-4-1、Zn フィンガードメインの機能

Zn フィンガードメインは DNA 結合ドメインであり、この領域を欠くと転写因子として機能しないことが予測される。実際に Zn フィンガードメインを全て欠いた *Form 1* のルシフェラーゼ活性は対照胚 (β -gal) と同程度の活性を示した。Zn フィンガードメインを一部欠く *Form 2* のルシフェラーゼ活性は対照胚よりも低かったが、原腸陥入阻害効果は見られなかった。これらの結果から *fibronectin* の転写抑制には Zn フィンガードメインが 2 つで十分であるが、*cpg* が原腸陥入を阻害するように機能するためには完全な Zn フィンガードメインが重要であることが分かった。しかし、*Form 3-12* の各コンストラクトにおけるルシフェラーゼ活性や原腸陥入阻害の効果はそれぞれ異なっており、*cpg* には Zn フィンガードメイン以外にも幾つかの機能ドメインが存在することが予測された。そこで、さらに各ドメインの機能解析を進めた。

5-4-2、POZ ドメインの機能

POZ ドメインは蛋白質間相互作用に寄与するドメイン (Bardwell and Treisman, 1994) で、この領域の有無によって転写因子としての機能が異なるという報告がある (Widom et al., 1997)。POZ ドメインを一部欠いた *Form 3*、もしくは全て欠く *Form 4-7* では原腸陥入の阻害は起こらなかった。*Form 4-7* のルシフェラーゼ活性の値は各実験毎に大きく振れたが、これらのコンストラクトのルシフェラーゼ活性は、対照胚と有為な差がないか、もしくは逆に高くなった。これらの結果は *cpg* の原腸陥入阻害には POZ ドメインが転写抑制ドメインとして機能することが必要であることを示す。

5-4-3、その他の領域の役割

原腸陥入阻害の確認されたコンストラクトの中で C 末端領域を含む *Form 9* は *cpg* と同レベルのルシフェラーゼ活性を示し、C 末端領域を含まない *Form 8*、*11* は *cpg* よりもさらに低い活性 (強い抑制) を示した。さらに、原腸陥入阻害が起こらなかった *Form 4* と *5* または *Form 6* と *7* のルシフェラーゼ活性を比較しても、C 末領域を含む *Form 4*、*6* の方が含まない *Form 5* と *7* よりもルシフェラーゼ活性は高かった。これらの結果は C 末領域が転写活性化ドメインとして機能することを示唆する。

Form 4、*5* と *Form 6*、*7* のルシフェラーゼ活性を比較すると、Zn フィンガードメインより N 末領域が短い方が活性が高かった。しかし、*cpg* と *Form 9* のルシフェラーゼ活性は逆の傾向を示した。これらの結果は POZ ドメインと Zn フィンガードメインの間の領域にも何らかの転写調節ドメインが存在することを示唆するが、今後さらに詳しく解析を進めなければならない。

5-4-4、核内移行シグナルの機能

PSORT (Nakai and Horton, 1999) によって *cpg* には 3 箇所の核内移行シグナルが予測された。3 つの核内以降シグナルを N 末端から NLS1、NLS2、NLS3 とし

て、それぞれに対してディリーションコンストラクト *Form 8-12* を作成し、それぞれのコンストラクトの過剰発現胚の形態を観察した。その結果、全ての核内移行シグナルを欠く *Form 12* と NLS2 のみを欠く *Form 10* では原腸陥入の阻害は起こらなかったが、NLS1 と NLS2 あるいは NLS2 と NLS3 を含む *Form 8、9* さらに、NLS2 のみを含む *Form 11* でも原腸陥入は阻害された。また *Form 10、11* と GFP の融合 mRNA (*Form 10-GFP、Form 11-GFP*) を作成し、その蛋白質が核内に移行するかを調べた。各 mRNA (1ng) を 2 細胞期の両割球の動物極に顕微注入し、原腸胚期 st.11 に animal cap を一部切除し、蛍光を観察した結果、NLS2 のみを含む *Form 11-GFP* が強く核内に移行しているのに対して、NLS2 のみを含まない *Form 10-GFP* は核内にほとんど移行しないことが分かった (図 27)。これらの結果は、cpg の 3 つの核内移行シグナルの内 NLS2 の核移行シグナルが最も重要であることを示す。

原腸陥入阻害の起こらなかった *Form 10、12* は完全な POZ、Zn フィンガードメインを両方を有しているにも関わらず、それらの過剰発現胚でのルシフェラーゼ活性は cpg よりも高かった。この結果は NLS2 領域 (22 a.a.) が核内移行に機能するだけでなく、POZ ドメインが転写抑制ドメインとして機能するために必要な領域であることを示唆する。

考察

形態形成運動における *cpg* の働き

原腸陥入は4つの要素、ボトル細胞の形成、動物半球のエピボリー、卵割腔内壁に沿った深層中胚葉の移動、帯域の(*noninvoluting*, *involuting*)細胞の *convergent extension* 運動によって説明される (Keller, 1980; Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Hardin and Keller, 1988; Keller and Tibbetts, 1989; Wilson and Keller, 1991; Keller and Jansa, 1992; Keller et al, 1992; Shih and Keller, 1992a, b)。中胚葉の移動やボトル細胞の形成を阻害したり、動物半球を除去した場合でも、原口は閉じ原腸陥入は起こる (Keller, 1981; Keller and Jansa, 1992) ので、*convergent extension* が原腸陥入に最も重要な要素と考えられる。*cpg* mRNA 過剰発現胚では咽頭内胚葉及び中胚葉の移動は起こっており、ボトル細胞の形成は出現時期と形態共に正常であった。しかし、初期の動物半球のエピボリーは阻害されており、*convergent extension* 運動も阻害されていた。さらに、*cpg* 過剰発現胚から得た Keller サンドウィッチや高濃度 *activin* で処理を行った *animal cap* 外植体の *convergent extension* 運動も阻害され、伸張反応は見られなかった。これらの結果は *cpg* による原腸陥入阻害が主に初期の *epiboly* や *convergent extension* 運動の阻害によるものであることを示唆している。*cpg* 過剰発現胚や高濃度 *activin* で処理した *cpg* 過剰発現胚の *animal cap* における組織分化マーカー遺伝子の発現量は対照胚と比較して顕著な差は見られなかった。これらの結果は *cpg* が組織分化に関与せず、直接 *epiboly* や *convergent extension* 運動のみに影響していることを示唆する。

epiboly や *convergent extension* 運動は *planar* 方向及び *vertical* 方向の細胞の *intercalation* による方向性を持った細胞の配置換えによって起こると説明されている (Keller, 1980; Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Hardin and Keller, 1988; Keller and Tibbetts, 1989; Wilson and Keller, 1991; Keller and Jansa, 1992; Keller et al, 1992; Shih and Keller, 1992a, b)。細胞の再配置は細胞骨格の変化に伴う細胞の形状変化と隣接する細胞間の断続的な接着性の変化によって起こる。*cpg* によ

る intercalation の障害が細胞骨格の変化によるものであれば、卵割初期での細胞分裂や細胞増殖に異常が見られるはずであるが、そのようなことは観察されなかった。したがって、*cpg* は細胞間あるいは細胞と細胞外基質間の接着性に変化を生じさせることによって convergent extension 運動の障害を引き起こしたと考えられる。しかし、現在までに報告されている convergent extension 運動を障害する接着分子 *C-cadherin* (Zhong et al., 1999) や *PAPC* (Kim et al., 1998) の発現量は *cpg* によって影響されていなかった。したがって、これらの接着分子以外に convergent extension 運動に影響を及ぼす未知の分子が存在し、*cpg* がその未知の分子の発現を制御していると考えられる。

cpg の発現

cpg mRNA は maternal に存在するが、2 細胞期に *cpg* mRNA を顕微注入しても原腸胚期までの発生は正常であり、初期卵割期での *cpg* の機能は明らかではない。*cpg*-GFP 蛋白質の核内移行は MBT 以後に確認でき、*cpg* は zygotic に機能していることが示唆される。神経胚期以後は *cpg* の発現域が胚の前方部、特にセメント腺に局在するようになるので、発生後期においては組織分化に参与している可能性があることが示唆される。実際に発生後期に *cpg* は *collagen type I alpha 1*、*fibronectin* の転写抑制因子として機能していると考えられる。*cpg* は神経胚期以後にその発現量が増大し、原腸胚期における発現量は少ないため、*cpg* の主要な機能は神経胚期以後の細胞外基質を転写制御しているのかも知れない。原腸胚期における *cpg* の過剰発現がその機能部位が類似した他の転写因子の働きを模倣しているに過ぎないという可能性もある。この問題については、今後の研究により明らかにしていかなければならない。

POZ 遺伝子の中にはいくつかの補因子と共に転写調節を行うものがある (Kaplan and Calame, 1997; Dhordain et al., 1998; Ahmad et al., 1998)。原腸胚期に convergent extension 運動は背側帯域で始まるが、その時期に *cpg* は胚に一様に存在している。したがって、POZ 遺伝子である *cpg* が機能するためには他の POZ 遺伝子と同様に胚内に局在する補因子が必要であることが示唆される。

転写抑制因子としての *cpg*

POZ ドメインは進化的に保存された蛋白質間相互作用に必要な領域で C₂H₂ タイプの Zn フィンガー蛋白質の N 末領域の 5-10% 長に位置しており (Bardwell and Treisman, 1994)、染色体のコンフォメーションを制御して遺伝子の発現を調節する (Albagli et al., 1995)。多くの POZ 遺伝子は転写抑制因子として報告されている (Dhordain et al., 1998; Ahmad et al., 1998) が、転写活性化因子として報告されている場合もある。さらに、ZF5 の POZ ドメインは転写活性、転写抑制の両方の機能に関与することが知られている (Kaplan and Calame, 1997)。

BLAST のホモロジー検索によって *cpg* はヒト *hc-krox*、マウス *mc-krox* と高い相同性を示し、特に POZ ドメインと Zn フィンガードメインでの相同性が高かった。しかし、それらの領域以外の相同性は低いので、*cpg* はアフリカツメガエル *c-krox* とは異なる *c-krox* ファミリー遺伝子の一つであると考えた。*hc-krox* は *collagen type I alpha 1*、*fibronectin* の転写抑制因子であり (Widom et al., 1997)、*mc-krox* は *collagen type I alpha 1*、2 の転写活性化因子である (Galera et al., 1994; Galera et al., 1996)。ヒトとマウス *c-krox* 両遺伝子における機能の違いは *mc-krox* が N 末領域の POZ ドメイン領域が不完全であり、完全な POZ ドメインを有する *hc-krox* より短いことから生じていると考えられる。*cpg* は完全な POZ ドメインを有し、特に Zn フィンガードメインにおける *hc-krox* との相同性は 93.5% あり、*hc-krox* と同様に転写抑制因子として機能することが予測される。*cpg* が実際にアフリカツメガエル *collagen type I alpha 1*、*fibronectin* の転写抑制因子として機能している可能性も示唆された。

原腸胚期での *cpg* のターゲット遺伝子

cpg と *collagen type I alpha 1* の発現域は相補的であったので、*cpg* が *collagen type I alpha 1* の転写を抑制している可能性が示唆された。しかし、*collagen type I alpha 1* mRNA は原腸胚期に検出されないので、*cpg* による原腸陥入阻害に関与するターゲット遺伝子では無いと考えられる。

fibronectin のプロモーター領域を含むルシフェラーゼリポーター遺伝子 (Gradl et al., 1999) は原腸胚期以後に *cpg* によって転写が抑制されることを示した。しかし、*fibronectin* は maternal な mRNA が大量に存在し、zygotic な発現は原口がほぼ閉じてしまう原腸胚期後期 st.12 から始まり、その発現量が多いことが知られている (Lee et al., 1984; DeSimone et al., 1992)。したがって、胚内での *cpg* による発現量の変化の検出は困難であると考えられる。実際に *cpg* 過剰発現胚での *fibronectin* mRNA の量は正常胚と同じレベルであった。形態学的な観察により、*fibronectin* は咽頭内胚葉及び中胚葉の移動に関与している (Nakatsuji, 1986; Winklbauer, 1990; Ramos and DeSimone, 1996; Ramos et al., 1996; Winklbauer and Keller, 1996) ことが報告されているが、*cpg* 過剰発現胚の咽頭内胚葉及び中胚葉の移動はほぼ正常であった。また、convergent extension 運動は *cpg* によって阻害されるが、*fibronectin* による影響は受けない (Keller and Jansa, 1992; Smith et al., 1990)。したがって、*fibronectin* も *cpg* による原腸陥入阻害に関与するターゲット遺伝子では無いと考えられる。

すでに述べたように *cpg* の過剰発現は、現在知られている convergent extension を阻害する接着分子 *C-cadherin* (Lee and Gumbiner, 1995; Zhong et al., 1999)、*PAPC* (Kim et al., 1998) の発現量にも影響を与えなかった。したがって、これらの遺伝子以外に原腸陥入阻害に関与する直接的な *cpg* のターゲット遺伝子が存在することが予測される。*hc-krox* は *biglycan* の上流領域にも結合することが報告されており (Heegaard et al., 1997)、*biglycan* が原腸陥入阻害に関与する直接的な *cpg* のターゲット遺伝子かも知れないので、現在アフリカツメガエルの *biglycan* の単離を試みている。

最近 *hc-krox* が結合する領域に同様に結合能を持つ *OCZF* (osteoclast-derived zinc finger) が単離された (Kukita et al., 1999)。さらに *mc-krox* はホモダイマー複合体を形成 (Galera et al., 1996) し、他の *POZ/Zn* フィンガー蛋白質もホモ、ヘテロ-ダイマー複合体を形成するという報告もある (Li et al., 1997; Ahmad et al., 1998; Davies et al., 1999)。これらは *cpg* と共同して共通のターゲット遺伝子の転写を調節する遺伝子の存在も示唆する。今後は、*cpg* のターゲット遺伝子や補因

子、さらには他の *cpg* 様の POZ/Zn フィンガー型転写因子を単離して、原腸陥入の分子機構を明らかにしていかなければならない。

cpg の転写調節機構

mc-krox はターゲット遺伝子である *collagen type I alpha 1* のプロモーター領域の複数の G+C rich ドメインに結合する (Galera et al., 1994; Galera et al., 1996) が、これらの結合サイトは *collagen type I alpha 1* の転写活性化因子である *CBF*

(CCAAT binding factor) (Maity et al., 1988)、*Sp1* (Nehls et al., 1991; Nehls et al., 1992; Li et al., 1995; Chen et al., 1998; Artlett et al., 1998)、*SP-3* (Chen et al., 1998) の結合サイトと重複するか、もしくは近傍であるので、それぞれの転写因子が拮抗的にプロモーター領域に結合し転写調節していると考えられる。*cpg* の Zn フィンガードメインは *mc-krox*、*hc-krox* と非常に高い相同性を示すので、*cpg* は *c-krox* と同じターゲット遺伝子のプロモーター領域の結合サイトを認識し、他の転写活性化因子と拮抗的にターゲット遺伝子の転写調節を行うことが予測される。

hc-krox が *fibronectin* の転写抑制因子として機能した (Widom et al., 1997) のと同様に *cpg* はアフリカツメガエルの *fibronectin* プロモーター領域を含むルシフェラーゼリポーター遺伝子の転写を抑制した。したがって、*cpg* の Zn フィンガードメインがアフリカツメガエル *fibronectin* プロモーター領域に結合し、その転写を抑制することが示唆される。*fibronectin* のプロモーター領域には CCAAT サイト、*Sp1* 結合サイトや複数の G+C rich 領域が存在し、複数の転写活性化因子が結合することが予測される。*cpg* のディリーションコンストラクトの中で Zn フィンガードメインの一部を欠く *Form 2* では *fibronectin* の転写活性は下がったが、原腸陥入の阻害は起こらなかった。これらの結果から、*cpg* が *fibronectin* のプロモーター領域に結合するには N 末端側の 2 つ Zn フィンガードメインで十分であるが、原腸陥入阻害に関与するターゲット遺伝子に対しては完全な Zn フィンガードメインが必要であることが示唆される。完全な Zn フィンガードメインを

有するディリーションコンストラクト *Form 3-12* でも、*fibronectin* の転写活性の値や原腸陥入阻害効果の有無に関しての結果は異なっており、*cpg* には転写調節に関わる複数の機能ドメインが存在すると考えられる。*Form 3-12* を大まかに分類すると3つのグループに分かれる。*fibronectin* の転写を抑制し、*cpg* と同様に原腸陥入阻害を起こすグループ1 (*Form 8, 9, 11*)、*fibronectin* の転写は抑制するが、原腸陥入阻害は起こさないグループ2 (*Form 3, 10, 12*)、*fibronectin* の転写は有意に下げない、もしくは転写を活性化し、原腸陥入の阻害も起こさないグループ3 (*Form 4-7*) に分けられる。3つのグループの違いは POZ ドメインの有無、もしくは POZ ドメインが機能しているかどうかということにある。

まず、POZ ドメインの無いグループ3のコンストラクトが *fibronectin* の転写を活性化する傾向を示したことから、POZ ドメインは *cpg* が転写抑制因子として機能するために必要なドメインであると考えられる。さらに、過剰発現させたコンストラクトは大量に存在するため、*fibronectin* のプロモーター領域において *cpg* の結合サイトの近傍に結合すると考えられる SP1 や CBF 等の転写活性化因子は結合できないと推測されるが、転写は活性化する傾向を示したので、グループ3のコンストラクトは他の転写活性化因子と同等の転写活性化能を有することも示唆される。

次にグループ2のコンストラクトでは対照胚よりも *fibronectin* のリポーター遺伝子の転写活性を下げた (48~58) が、*cpg* を含め、原腸陥入阻害を起こしたグループの値 (9~25) の約2倍以上であることから、原腸陥入を阻害するためには、それに関与する *cpg* のターゲット遺伝子のより強い転写抑制が必要であることが分かる。また、グループ2のコンストラクトでの低い転写抑制は、それらのコンストラクトが大量に存在するために、胚内に本来存在する SP1 や CBF 等の転写活性化因子の結合を拮抗的に阻害した結果であるとも考えられる。グループ1と2のコンストラクトを比較すると、より強い転写抑制能を有するためには、*Form 3* の結果より完全な POZ ドメインが必要であること、さらに完全な POZ ドメインと共に *Form 10, 12* の結果より NLS2 を含む領域が必要である

ことが考えられる。転写活性化因子である *mc-krox* は POZ ドメインの N 末端領域を欠いているが、これと同じ領域を欠いた *hc-crox* のディリーションコンストラクトは全長 *hc-krox* と同様に転写抑制因子として機能した (Widom et al., 1997)。しかし、*cpg* で POZ ドメインで *mc-krox* と同じ領域を欠いた *Form 3* は *cpg* のような転写活性の強い抑制は見られず、原腸陥入阻害も起こらなかった。また、*Form 3* は *mc-krox* のように積極的に転写活性化因子として機能しておらず、現時点での POZ ドメインの長さによる機能の違いは謎であり、今後さらに解析していく必要がある。

上記の分類とは別に *cpg* と *Form 8*、*Form 4* と *5*、*Form 6* と *7* の *fibronectin* での転写活性を比較すると C 末端を有する *cpg*、*Form 4*、*Form 6* での転写活性が大きいので、*cpg* の C 末端領域が転写活性化ドメインとして機能することが予測される。また、*cpg* と *Form 9*、*Form 4* と *6*、*Form 5* と *7* のルシフェラーゼ活性にも違いが確認されたが、全て同じ傾向を示すとは限らないので、POZ と Zn フィンガードメインに挟まれる領域に関しては今後さらに詳しく解析を進めなければならない。

Wnt パスウェイにおける転写因子 XTcf-3 は N 末領域に β -catenin が結合すれば、転写活性型に機能し (Molenaar et al., 1996; Roose et al., 1998)、C 末領域に Groucho (Brannon et al., 1997) や CTBP (Brannon et al., 1999) が結合すると転写抑制因子として働く。*cpg* の場合も POZ ドメインが無くなれば転写抑制能は低下し、原腸陥入阻害も起こらなかった。また、C 末領域が活性化ドメインとして考えられるが、このことは *cpg* に複数の補因子が結合することを示唆している。

cpg の予測される 3 箇所の核内移行シグナルの内、真ん中の NLS2 の領域が存在するときのみ原腸陥入阻害が起こり、実際に NLS2 のみを欠く *Form 10*-GFP よりも NLS2 のみを持つ *Form 11*-GFP の方が核内での強いシグナルが観察されるので、NLS2 が *cpg* の核内移行に最も重要であると考えられた。しかし、NLS2 を含む *cpg*-GFP は MBT 以前は自律的に核内に移行しなかったので、*Form 10* で欠いている僅かな領域 (22 a.a.) に核内移行に必要な補因子が結合すると考えら

れる。今後、cpg の NLS2 シグナルにポイントミューテーションを入れたコンストラクトの核内移行を調べると共に、MBT 前後での cpg の核内移行の解析を詳しく進めなければならない。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご協力をして下さった以下の方々に厚くお礼申し上げます。

本研究の共同研究をおこなっていただいた関西学院大学の木下勉助教授には研究を進める上でご協力やご指導をいただき、心から感謝いたします。また、RT-PCR 解析やシーケンス解析を担当していただいた共同研究者である関西学院大学の長谷川光一氏、堅田智久氏に感謝いたします。本研究の実験方法に関するご助言ならびに貴重なプラスミドの供与をしていただいた橋本主税博士には深く感謝いたします。human recombinant activin A を快く供与して下さった「味の素(株)」の江藤譲氏、pCS2mt-UGP を供与して下さった Klymkowsky 博士、fibronectin のルシフェラーゼリポーター遺伝子を供与して下さった Wedlich 博士に深く感謝いたします。ルシフェラーゼ活性の測定に際して、ルミノスキャン TL を快くお貸しいただいた飯哲夫助教授には深く感謝いたします。そして、本研究を行うに際し、研究内容に関する熱心な議論をしていただいた、動物学教室発生生物学研究室および分子発生生物学研究室内の皆様に礼を申し上げます。

最後に、指導教官として、また共同研究者として、適切なご指導とご助言を下さり、本稿に対しても精読と批評をして下さりました京都大学理学研究科久保田洋助教授に心から感謝いたします。

引用文献

- Ahmad, K. F., Engel, C. K. and Prive, G. G.** (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA* **95**, 12123-12128.
- Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G. and Leprince, D.** (1995). The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* **6**, 1193-1198.
- Artlett, C. M., Chen, S. J., Varga, J. and Jimenez, S. A.** (1998). Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF-1/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix Biol.* **17**, 425-434.
- Asahina, K., Utoh, R., Obara, M. and Yoshizato, K.** (1999a). Cell-type specific and thyroid hormone-dependent expression of genes of alpha1(I) and alpha2(I) collagen in intestine during amphibian metamorphosis. *Matrix Biol.* **18**, 89-103.
- Asahina, K., Obara, M. and Yoshizato, K.** (1999b). Expression of genes of type I and type II collagen in the formation and development of the blastema of regenerating newt limb. *Dev. Dyn.* **216**, 59-71.
- Bardwell, V. J. and Treisman, R.** (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* **8**, 1664-1677.
- Boucaut, J. C., Darribere, T., Poole, T. J., Aoyama, H., Yamada, K. M. and Thiery, J. P.** (1984). Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: a competitive peptide inhibitor of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. *J. Cell Biol.* **99**, 1822-1830.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T. and Kimelman, D.** (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* **11**, 2359-2370.
- Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D. and Moon, R. T.** (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* **126**, 3159-3170.
- Chen, S. J., Artlett, C. M., Jimenez, S. A. and Varga, J.** (1998). Modulation of human alpha1(I) procollagen gene activity by interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors in vitro. *Gene* **215**, 101-110.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Davies, J. M., Hawe, N., Kabarowski, J., Huang, Q. H., Zhu, J., Brand, N. J., Leprince, D., Dhordain, P., Cook, M., Morriss-Kay, G. and Zelent, A. (1999). Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a potential target of the LAZ-3/BCL-6 oncogene. *Oncogene* **18**, 365-375.

DeSimone, D. W., Norton, P. A. and Hynes, R. O. (1992). Identification and characterization of alternatively spliced fibronectin mRNAs expressed in early *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **149**, 357-369.

Dhordain, P., Lin, R. J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., Evans, R. M. and Albagli, O. (1998). The LAZ3 (BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4645-4651.

Galera, P., Musso, M., Ducy, P. and Karsenty, G. (1994). c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA* **91**, 9372-9376.

Galera, P., Park, R. W., Ducy, P., Mattei, M. G. and Karsenty, G. (1996). c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 21331-21339.

Gradl D., Kuhl M. and Wedlich D. (1999). The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5576-5587

Hadeball, B., Borchers, A. and Wedlich, D. (1998). *Xenopus* cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal. *Mech. Dev.* **72**, 101-113.

Hardin, J. and Keller, R. (1988). The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* **103**, 211-230.

Harland, R. (1991). *In situ* hybridization: an improved method for *Xenopus* embryos. In *Methods in Cell Biology*, vol. 36 (ed. Kay, B.K. and Peng, H.B.), pp. 685-695. San Diego: Academic press, Inc.

Heegaard, A. M., Gehron Robey, P., Vogel, W., Just, W., Widom, R. L., Scholler, J., Fisher, L. W. and Young, M. F. (1997). Functional characterization of the human biglycan 5'-flanking DNA and binding of the transcription factor c-Krox. *J. Bone. Miner. Res.* **12**, 2050-2060.

Kaplan, J. and Calame, K. (1997). The ZIN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1108-1116.

Keller, R. E. (1980). The cellular basis of epiboly: an SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **60**, 201-234.

- Keller, R. E.** (1981). An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in gastrulation of *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* **216**, 81-101.
- Keller, R. E., Danilchik, M., Gimlich, R., Shih, J.** (1985). The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **89 Supplement**, 185-209.
- Keller, R. and Danilchik, M.** (1988). Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* **103**, 193-209.
- Keller, R. and Tibbetts, P.** (1989). Mediolateral cell intercalation in the dorsal, axial mesoderm of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **131**, 539-549.
- Keller, R.** (1991). Early embryonic development of *Xenopus laevis*. In *Methods in Cell Biology*, vol. 36 (ed. Kay, B.K. and Peng, H.B.), pp. 61-113. San Diego: Academic press, Inc.
- Keller, R. and Jansa, S.** (1992). *Xenopus* Gastrulation without a blastocoel roof. *Dev. Dyn.* **195**, 162-176.
- Keller, R., Shih, J. and Domingo, C.** (1992). The patterning and functioning of protrusive activity during convergence and extension of the *Xenopus* organiser. *Development Supplement*, 81-91.
- Kim, S. H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E. and De Robertis, E. M.** (1998). The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* **125**, 4681-4690.
- Kukita, A., Kukita, S., Ouchida, M., Maeda, H., Yatsuki, H. and Kohashi, O.** (1999). Osteoclast-derived zinc finger (OCZF) protein with POZ domain, a possible transcriptional repressor, is involved in osteoclastogenesis. *Blood* **94**, 1987-1997.
- Lee, G., Hynes, R. and Kirschner, M.** (1984). Temporal and spatial regulation of fibronectin in early *Xenopus* development. *Cell* **36**, 729-740.
- Lee, C. H. and Gumbiner, B. M.** (1995). Disruption of gastrulation movements in *Xenopus* by a dominant-negative mutant for C-cadherin. *Dev. Biol.* **171**, 363-373.
- Li, L., Artlett, C. M., Jimenez, S. A., Hall, D. J. and Varga, J.** (1995). Positive regulation of human alpha 1 (I) collagen promoter activity by transcription factor Sp1. *Gene* **164**, 229-234.
- Li, S. W., Khillan, J. and Prockop, D. J.** (1995). The complete cDNA coding sequence for the mouse pro alpha 1(I) chain of type I procollagen. *Matrix Biol.* **14**, 593-595.
- Li, X., Lopez-Guisa, J. M., Ninan, N., Weiner, E. J., Rauscher, F. J. 3rd.**

- and Marmorstein, R.** (1997). Overexpression, purification, characterization, and crystallization of the BTB/POZ domain from the PLZF oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **272**, 27324-27329.
- Maity, S. N., Golumbek, P. T., Karsenty, G. and de Crombrughe, B.** (1988). Selective activation of transcription by a novel CCAAT binding factor. *Science* **241**, 582-585.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. and Clevers, H.** (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**, 391-399.
- Nakai, K. and Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 34-35.
- Nakatsuji, N.** (1986). Presumptive mesoderm cells from *Xenopus laevis* gastrulae attach to and migrate on substrata coated with fibronectin or laminin. *J. Cell Sci.* **86**, 109-118.
- Nehls, M. C., Rippe, R. A., Veloz, L. and Brenner, D. A.** (1991). Transcription factors nuclear factor I and Sp1 interact with the murine collagen alpha 1 (I) promoter. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4065-4073.
- Nehls, M. C., Grapillon, M. L. and Brenner, D. A.** (1992). NF-I/Sp1 switch elements regulate collagen alpha 1(I) gene expression. *DNA Cell Biol.* **11**, 443-452.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J.** (1967). Normal table of *Xenopus laevis*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- Okayama, H., Kawaichi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokota, T. and Arai, K.** (1987). High-efficiency cloning of full-length cDNA; construction and screening of cDNA expression libraries for mammalian cells. *Methods Enzymol.* **154**, 3-28.
- Ramos, J. W. and DeSimone, D. W.** (1996). *Xenopus* embryonic cell adhesion to fibronectin: position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation. *J. Cell Biol.* **134**, 227-240.
- Ramos, J. W., Whittaker, C. A. and DeSimone, D. W.** (1996). Integrin-dependent adhesive activity is spatially controlled by inductive signals at gastrulation. *Development* **122**, 2873-2883.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O. and Clevers, H.** (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608-612.

- Sambrook F., Fritsh E. F. and Maniatis T.** (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd. Ed. Cold Spring Habor Laboratory, New York.
- Shih, J. and Keller, R.** (1992a). Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 901-914.
- Shih, J. and Keller, R.** (1992b). Patterns of cell motility in the organizer and dorsal mesoderm of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 915-930.
- Smith, J. C., Symes, K., Hynes, R. O. and DeSimone, D.** (1990). Mesoderm induction and the control of gastrulation in *Xenopus laevis*: the roles of fibronectin and integrins. *Development* **108**, 229-238.
- Stewart, R. M. and Gerhart, J. C.** (1990). The anterior extent of dorsal development of the *Xenopus* embryonic axis depends on the quantity of organizer in the late blastula. *Development* **109**, 363-372.
- Symes, K. and Smith, J. C.** (1987). Gastrulation movements provide an early marker of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Development* **101**, 339-349.
- Symes, K., Yordan, C. and Mercola, M.** (1994). Morphological differences in *Xenopus* embryonic mesodermal cells are specified as an early response to distinct threshold concentrations of activin. *Development* **120**, 2339-2346.
- Widom, R. L., Culic, I., Lee, J. Y. and Korn, J. H.** (1997). Cloning and characterization of hcKrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression. *Gene* **198**, 407-420.
- Wilson, P. and Keller, R.** (1991). Cell rearrangement during gastrulation of *Xenopus*: direct observation of cultured explants. *Development* **112**, 289-300.
- Winklbauer, R.** (1990). Mesodermal cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Dev. Biol.* **142**, 155-168.
- Winklbauer, R. and Keller, R. E.** (1996). Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **177**, 413-426.
- Zhong, Y., Briehner, W. M. and Gumbiner, B. M.** (1999). Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J. Cell Biol.* **144**, 351-359.

図と表

図 1、*cpg* のノーザンハイブリダイゼーション解析

卵巣より抽出した mRNA を 10 μ g 用いて行った。約 2.4k b の転写産物が検出された。

kb

2.54 ▶

0.79 ▶



図 2、*cpg* のシーケンス

cpg は 470a.a. をコードしており、N 末領域に POZ ドメイン (赤線)、C 末領域に 3 箇所の Zn フィンガードメイン (緑枠□) が存在した。PSORT によって 3 箇所の核内移行シグナル (黒枠 (□)) が予測された。

1 GGCACGAGCAGTGAATTTCTGTCAGTCAGAGCCACCCAGGAGCAACAGGAGCAGCAGGA
61 GGCGAGAGACAGGGGCCACAGCCTGACCCCGAGCCCCCACTTACCCCTGGAGCTGCTGC
121 TCTGACTCTGAAGCACAACCTGACACCAGCAGCTCGAATTTCGCACGCTACAGGTGGCTCC
181 GACGCACTGACGGGACAAGGAGCCTCTCCGCTCAGAACCAGGGACCTTGCTGCTGGCCCC

M A S S E D E L I G I P F P 14
241 GCTCAACCCCTCAGGTGAAGATGGCAAGCTCTGAGGACGAGCTGATCGGGATCCCTTTCCC
E H S S D L L S S L N E Q R H S G V L C 34
301 AGAGCACAGCAGTGTCTCTGAGCAGTCTGAATGAGCAGCGGCACAGCGGGTGTCTG
D I T I K T R G L E Y P T H R A V L A A 54
361 TGACATCACCATTAAAGACCCGCGGCTTGAGTACCCCAACCACGCGCAGTGTGGCGGC
C S D Y F R K M F T G M P G R G K C P D 74
421 CTGTAGCGACTACTTCCGCAAGATGTTCACTGGCATGCCAGGCCGAGGCAAGTGCCAGA
V C Q L D F L K P D A L G A L L D F A Y 94
481 CGTGTGCCAGCTGGATTTCTCAAACCCGACGCCCTGGGTGCCCTGCTGGACTTTGCCTA
T A T L T I S N G N M R D V L R A A R L 114
541 CACGGCGACCCTGACCATCAGTAATGGCAACATGCGGGACGTGCTGCGCGCTGCCAGGT
L E I P C V V H A C V D I L Q C N G H R 134
601 GCTGGAGATCCCTGCGTGGTGCATGCGTGTGTGGACATCCTGCAGTGCAACGGGCACCG
E E M G G D A E D L E C F L R A R Q Y L 154
661 GGAGGAGATGGGGGCGACGCGGAGGATCTGGAGTGTTCCTGCGGGCAGCTGACTTT
D S Y M E N G E N A T P P P E A E S P P 174
721 GGATAGTTATATGGAGAATGGGGAGAATGCAACTCCGCCCCCTGAAGCAGAGAGCCCCC
P H P H N I P V P P K S V Q I I P R R G 194
781 TCCTCATCTCACAATATTTCCCGTCCCCCAAAATCCGTGCAGATCATTTCCCGCGCGGG
R K K F L Q V N P N R R N Q N G N L L R 214
841 CAGGAAGAAATTCCTACAGGTCAATCCCAACCGCAGGAACAGAACGGGAATCTCCTCCG
G A D D S L E R D A S H A G S P P N E P 234
901 AGGGGCGACGACTCGCTGGAAGAGATGCCAGTCACGCTGGGTGCGCCCCCTAATGAGCC
S L G Y E T Y A Q D N G L G G H T I F V 254
961 AAGCTGGGCTACGAGACATACGCACAGGATAATGGATTGGGGGGCCACCATCTTTGT
P P S P P E E I L S D E E T S D M G F H 274
1021 CCCCCCTTACCCCCAGAAAGAAATCCTGTCTGATGAGGAGACGTCCGACATGGGCTTCCA
N P Y D L E N P V S A G L D V S D K L V 294
1081 CAACCCGTACGACCTGGAGAATCCGGTGAGTGCAGGACTGGATGTGAGCGACAAGCTGGT
R K R R S Q L P Q E C P V C H K I I H G 314
1141 GAGGAAACGACGCTCTCAGCTGCCCCAGGAATGTCCGCTGTGTCACAAGATTATCCACGG
A G K L P R H M E T H T G E K P F V C Q 334
1201 AGCCGCGCAAACCTGCCCCGCGACATGCGCACCCACACTGGCGAGAAACCCCTTTGTGTGCA
V C G V R F T R N D K L K I H M R K H T 354
1261 GGTGTGCGGAGTCAGGTTCAACAGGAATGACAAGCTGAAGATCCACATGCGCAAGCACAC
G E R P Y C C E H C S A R F L B S Y D L 374
1321 GGGTGAGCGTCCGTATTGCTGTGAGCACTGCAGCGCCGCTTCTTGACAGCTACGACCT
K N H M E L B T G D R P F E C S L C H K 394
1381 GAAGAACCACATGCACCTGCACACGGGCGACGGCCCTTCGAGTGCTCCCTGTGCCACAA
A F A K E D H L Q R H M K G Q N C L E V 414
1441 AGCCTTTGCCAAGGAGGACCACCTGCAGCGCCACATGAAGGGGCGAAGCTGCTGGAGGT
R T R R R R K E E P T V P H M H P A L D 434
1501 GCGCACCCGACGCCGACGCAAGGAGAGCCCACTGTACCCACATGCACCCGCCCTCGA
L S N G K L D D V P L S M I R F W G I P 454
1561 CCTGTCCAATGGCAAGCTAGACGATGTGCCTCTCTCCATGATTGCTTCTGGGGATCCC
V P R S G G G S P E G V L D A S * 470
1621 GGTGCCTCGCTCTGGGGGGGCGAGTCCGAGGGGGTTTTGGACGCTTCATAGGGGTGAGG

1681 AGGGATGTTTCCCAATTCAGTGCAGCACTTCCGCTAACCCCTCCCCCACTAAAGCCCCA
1741 TTCCCCCTCCACTTTAGTGTGAGACTCCCCCTCCCCCGCATTACACACCAGATGATGTC
1801 ACACAGATCTGATGACATCATCACCTTAATAGCAGACTTAAGTGTCCATAAGGCCCCCAG
1861 GAGGGGGTAAGAGAAGAGACTGTTGGAGCGCGGAAGTTTAAAGCCTCAGGGATCAGTAA
1921 ATTGCGCTCTCTCCCCCACGTTGATGAGGCGCCACTTCCAGCCCCGCTCTCCTTAT
1981 TTAGGAAGAAAAGAGATAAATTGAATGCTATTTTATTTGAATGAGAAATCTAATATATA
2041 CTGTGCTGTATATAGAGATGGAGATGCCTATATAAATATATATATATATATATGAGTAT
2101 ATATAAATAGAAATATAAATGCTTAGGATTAAGGCTGACAAGTTATAGCAATAATAATAA
2161 TATTGTGACCAGGCTGCCCCGTGCTCGGTGCCCCAGCAACGTTCCATGGCAACACCTTGC
2221 TGTCAGGGTAAGAACGGGCGCCATCGCTGTGCTTTACTGTGGGTTTGGGGCACCAGGGG
2281 GGGTGCCTTGGTAGATTTGGGGGATGCACTTATTTGCGGCCCCCTCGGCGCAGGAGGT
2341 GTCGCCCCGCTGATGGTGGGTTTATATTTACCCATCTCTGACCACTGAGCGGCTCTGAT
2401 GTCATCACTAGAACTTCGTGATGTCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2461 AAA

図 3、cpg の POZ ドメインのコンセンサス

cpg はコンセンサスな 37a.a. 中 31a.a. (赤字) が一致していた。

)

)

cpg	LNEQRHSGVLCDDITIKTRGLEYPHTRAVLAACSDYFRKMFTGMPGRGKCPDVCQLDFLKPDALGALLDFAYTATLTISNGNMRDVLRAARLLEIPCVVHAC																									
POZ consensus sequence	L	LR	LCDV	I	VG	F	AHR	VLA	S	YF	LF			I	L	L	LL	F	Y	V	LL	A	L	I	L	C
	I	QL	FV	I	L	AE	I	G	R	I	S	F	ML	V	I	F	VV	Y		L	VI	S	Y	V	V	T
	F	MF	MS	C	V	IN	V	V		C	V	IY		L	T	V	II			I	IM	G		M	I	A
	M	F		T		CD				G				M		M	F			A	F			L	A	

図 4、cpg、hc-krox、mc-krox のアライメント

cpg は hc-krox、mc-krox と高い相同性を示した（灰色枠■）。hc-crox は POZ ドメイン（波線--）に関して 63.5%、hc-krox と mc-krox は共に Zn フィンガードメイン（実線—）に関して 93.5%のアミノ酸残基の一致が確認された。黒枠（□）は核内移行シグナルを示す。

cpG MASSEDELIGIPFPEHSSDLLSSLNEQRHSGVLC DITIKTRGLEYP THRAVLAACSDYFR
hc-krox MGSPEDDLIGIPFPDHSSELLSCLNEQRQLGHLCDLTIRTQGLE YRTHRAVLAACSHYFK

cpG KMFT-----G--M-P-GRG--K--C-PDVCQLDFLKP DALGALLDFAYTATLTISNGNMRD
hc-krox KLFTEGGGGAVMGAGGSGTATGGAGAGVCELD FVGPEALGALLEFAYTATLTSSANMPA
MPA

cpG VLRAARLLEIPCVVHACVDILQCNHREEMGGDAEDLECFLRARQYLD SYMENGENA-TP
hc-krox VLQAARLLEIPCVIAACMEILQGSGL-EAPSPD-ED-DC-ERARQY LEAFATA--TA--S
mc-krox VLQAARLLEIPCVIAACMEILQGSGL-EAPSPD-ED-DC-ERARQY LEAFATATTTASTS

cpG -PPEAESPPPHPHNIPVPPKSVQIIIPRRGRK--K-FLQVNP NRRNQ---NG-NL---LR
hc-krox GVPNGEDSPPQVPLPPPPPPPPRPVARRSRKPRKAFLQTKGAR ANHLVPEVPTVPAHPLT
mc-krox GMPNGEDSPPQVPLLPPPPPPPPRPVARRSRKPRKAFLQTKGAR ANHLVPEAPT VLTHTPLT

cpG -GADDSLER-D--ASHA-G---SPP---NEPSLGYETYAQDNG--LGGHTIFVPP-S-P-
hc-krox YEEEEVAGRVGSSGGSGPGDSYSPPTGTAS PPEGPQSYEPYEGEEEEEEELVYPPAYGLAQ
mc-krox YEEEEEMVGRLGNSGGSGLGDSYSPPTGAAS PTEGPLNYEVFE GEEEEEEEMAYPPGYGLAQ

cpG PEE-ILSDEE-TSDMGFHN P-----Y--DLENPV SAGLDVS-DKLVRRKRSQLPQEC PVCH
hc-krox GGGPPLSPEELGSDEDAIDPDL MAYLSSLHQDN LAPGLDSQDKLV RKRRSQMPQEC PVCH
mc-krox SNEPSLSPEELGSDEDPIDPDL MAYLSSLHQGRPDTRPGWQDKLV RKRRSQMPQEC PVCH

cpG KIIHGAGKLP RHMRTHTGEKPFVCQVCGVR FTRNDKCLKIHM RKHTGERPYCCEHCSARFL
hc-krox KIIHGAGKLP RHMRTHTGEKPFACEVCGVR FTRNDKCLKIHM RKHTGERPYSCPHCPARFL
mc-krox KIIHGAGKLP RHMRTHTGEKPFACEVCGVR FTRNDKCLKIHM RKHTGERPYSCPHCPARFL

cpG HSYDLKNHMH LHTGDRPFEC SLCHKAFAKEDHLQRH MKGQNCLEVRTRRRRKEEPTVPH-
hc-krox HSYDLKNHMH LHTGDRPYECHLCHRAFAKEDHLQRHLKGQNCLEVRTRRRRRKDD-APPHY
mc-krox HSYDLKNHMH LHTGDRPYECHLCHKAFAKEDHLQRHLKGQNCLEVRTRRRRRKDDVAAPHY

cpG -----MHPA-LDLSNGKLDDVPLSMIRFW--G-IPVPRSGGGSPEGVLDAS
hc-krox PPPSTAAAFPA GLDLSNGHLDTFRLSLARFWEQSAPT WAPVSTPGPPDDDEEGAPTTPQ
mc-krox PPPSTTTSSPA GLDLSNGHLDTFHLSLARFWEQSATTGPPVTTQGPPEEEEEEGTPTTPQ

図 5、cpg の Zn フィンガードメインのアライメント

cpg の Zn フィンガードメインは他の krüppel 型 C_2H_2 タイプの Zn フィンガードメインと高い相同性を示した。(*) は C_2H_2 のシステイン、ヒスチジン残基を示す。(-) は一致したアミノ酸残基を示す。黒枠 (□) は Zn フィンガードメインを示す。

	*	*		*	*		*	*		*	*		*	*		*	*		*	*												
cpg	CPVCHKIIHGAGKLPRHMRTH										TGEKPFV	CQVCGVRFTRNDKLKIHMRRKH										TGERPYC	CEHCSARFLHSYDLKNHMHLLH									
hc-krox	-----										A-E-----	-----										S-P--P-----	-----									
mc-krox	-----										A-E-----	-----										S-P--P-----	-----									
APM-1	--I--	--V-M-----	-----										YM-TI-E-----	Q-----	-----										L-I--N-K-V-N-----	RI-						
OCZF	--I-E-V-Q-----	I-----	-----										YE-NI-K-----	Q----	V-----	-----										K--L-QQ-G-A-A-N-----	RV-					
mLRF	--I-E-V-Q-----	I-----	-----										YE-NI-K-----	Q----	V-----	-----										K--L-QQ-G-A-A-N-----	RV-					
gLRF	--I-A-V-Q-----	I-----	-----										YE-NI-N-----	Q----	V-----	-----										K--L-QQ-G-A-A-N-----	RV-					
Krüppel	-KI-SRSFGYKHV-QN-E-----	-----										E-PE-DK----	DHH--T---	L----	-----										K--H-SH-DRQ-VQVAN-RR-LRV-							
																					93.5%											
																					93.5%											
																					77.9%											
																					71.4%											
																					71.4%											
																					71.4%											
																					46.8%											

図 6、*cpg* の時間的発現 (RT-PCR)

各発生段階の胚から抽出した 1 μ g の全 RNA を用いて RT-PCR を行った。*cpg* は maternal に存在し、その後胞胚中期まで発現量は減少し、初期原腸胚期以後に zygotic な発現は徐々に増していった。(Oo) は卵母細胞を示し、(数字) は各発生ステージを示す。*Histone4* はインターナルコントロールとして用いた。

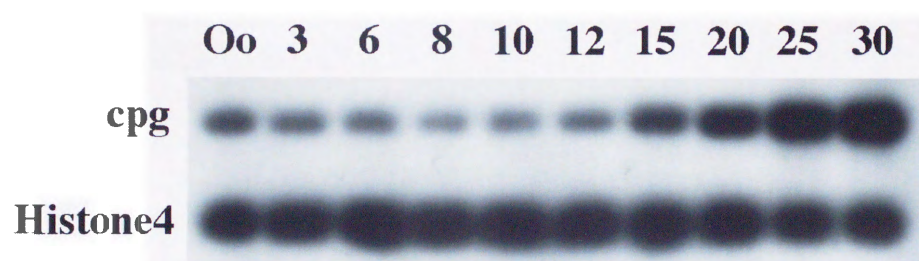


図 7、*cpg* の胞胚期、原腸胚期における空間的発現 (RT-PCR)

胞胚期 (st.8) と原腸胚期 (st.10) に胚を動植軸に沿って3つの領域 (動物極 (A)、帯域 (M)、植物極 (Vg))、背腹軸に沿って2つの領域 (背側半球 (D)、腹側半球 (Vn)) に分離し、各領域から抽出した 1 μ g の全 RNA を用いて RT-PCR を行った。胞胚期、原腸胚期において *cpg* は一様に発現していた。*Histone4* はインターナルコントロールとして用いた。

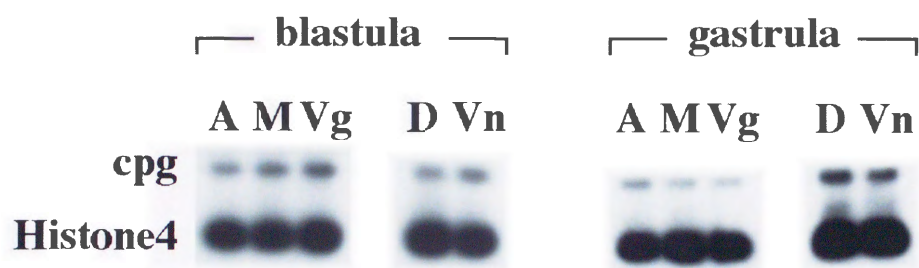
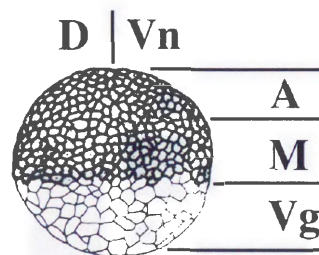


図 8、*cpg* の神経胚期以後の空間的発現 (whole mount *in situ* hybridization)
(A: 腹部面、B: 頭部面) 神経胚期 (st.16) に *cpg* は前方領域、特にセメント腺前駆領域に局在した。 (C: (st.25) 側面、D: (st.30) 側面) 尾芽胚期以後もセメント腺付近に局在し続けた。

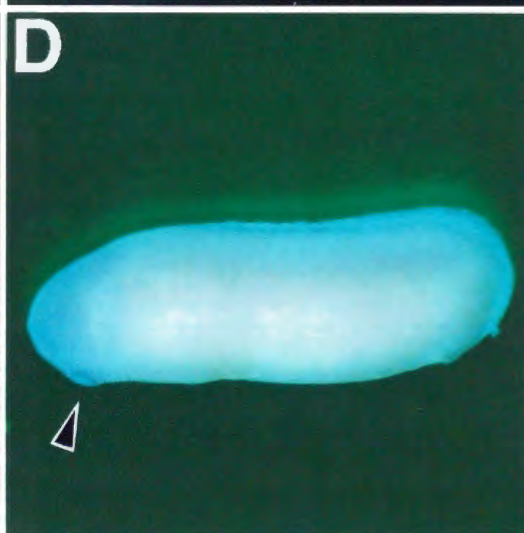
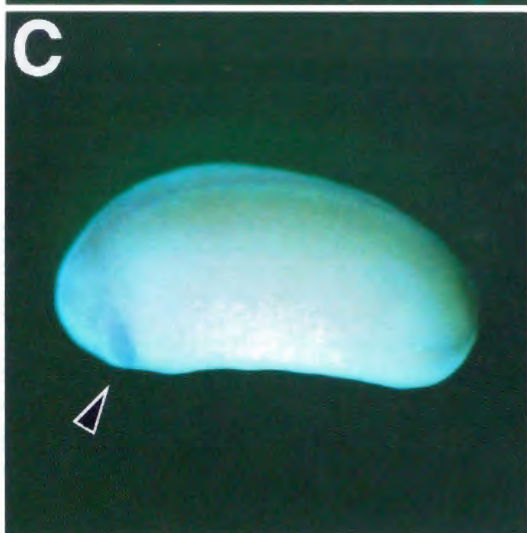
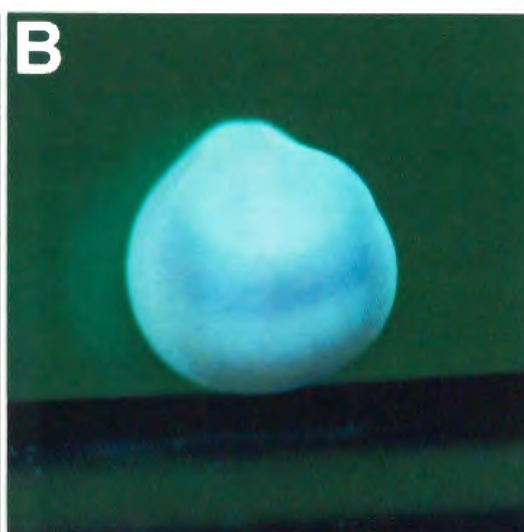
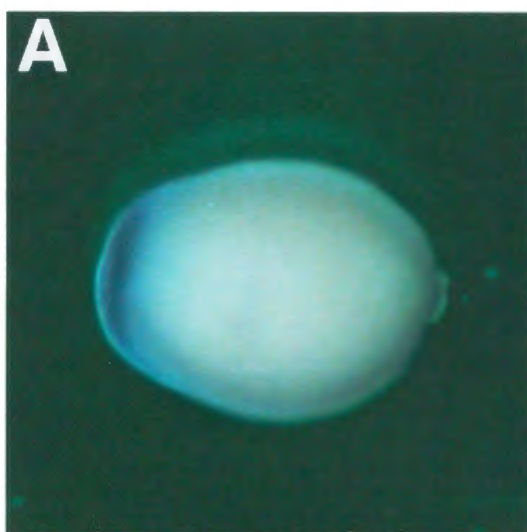


図 9、*cpg* による原腸陥入阻害 (1)

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、神経胚期 (st.20 : A、C、E)、尾芽胚期 (st.30 : B、D、F) に観察した。A、C、E の上段は側面、下段は植物極面。B、D、F は側面。(A、B) 正常胚。(C-F) *cpg* 過剰発現胚。(C、D) 原腸陥入阻害効果が弱かった胚では原口は閉じないが頭部領域を形成する胚が多く出現した。(E) 神経胚期に阻害効果が強かった胚では原腸は陥入せず、「マッシュルーム」様の形状となった。(F) 尾芽胚期には背腹軸に沿って伸長し、「にぎり寿司」様の形状となった。

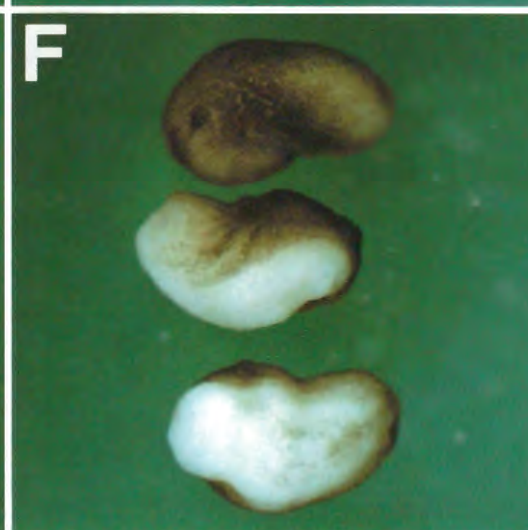
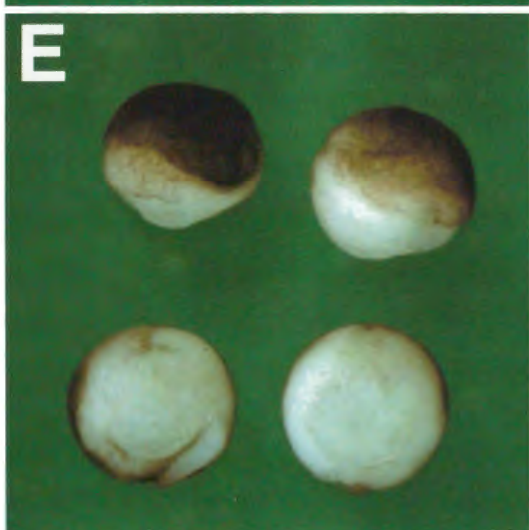
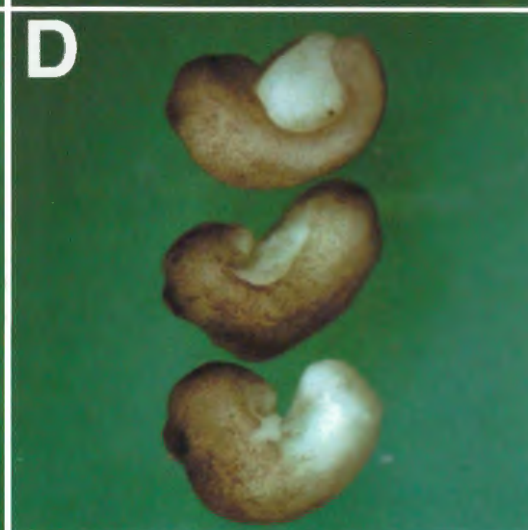
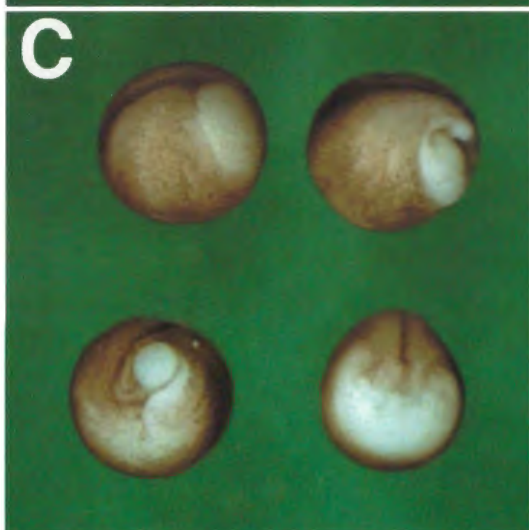
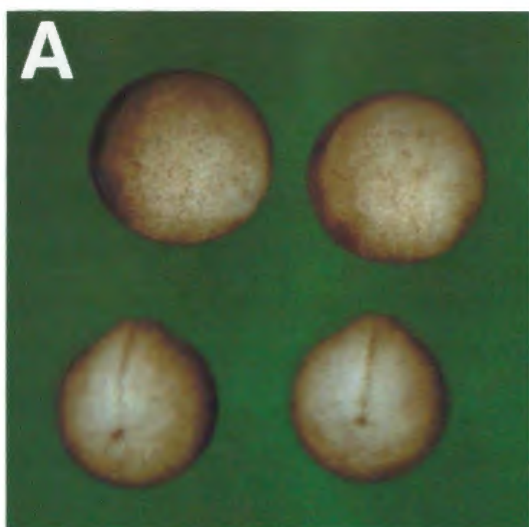


図 10、*cpg* による原腸陥入阻害 (2)

4細胞期胚の背側(A、B)もしくは腹側(C、D)の2割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、神経胚期(st.20 : A、C)、尾芽胚期(st.30 : B、D)に観察した。A、Cの左は側面、右は植物極面。B、Dは側面。(A、B)背側2割球帯域に顕微注入した胚は陥入阻害効果が強く、図9 E、Fと同様の形質が見られた。(C、D)4細胞期胚の腹側2割球帯域への注入では腹側の陥入のみが阻害され、背側の陥入は正常なため、前方部は正常な胚と発生した。このように *cpg* による原腸陥入阻害効果は注入領域に依存的であった。

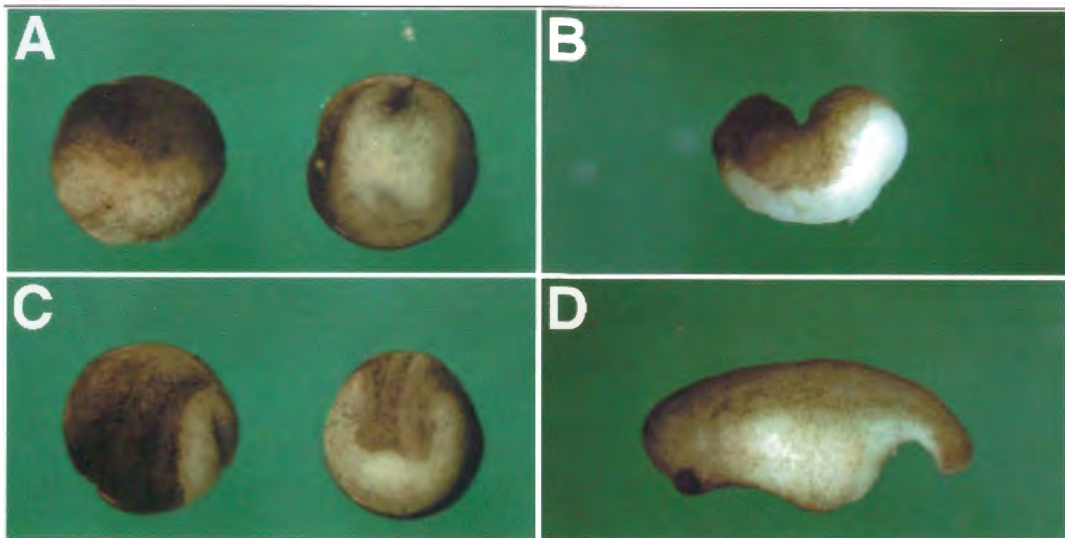


図 1 1、*cpg* 過剰発現胚の組織切片

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入した胚の切片を作成した。(A) 正常胚。(B-C) *cpg* 過剰発現胚。(A) 原腸胚期 st.11.5 に正常胚では原腸が陥入していた。(B) *cpg* 過剰発現胚では原口は出現する(矢尻)が、以後の陥入は全く進まなかった。

(C) 神経胚期 (st.20) にはマッシュルーム様の形状となり、深層中胚葉の移動は確認された。(D) 尾芽胚期 (st.30) には当初の原口付近に神経管 (Ne)、脊索 (No) 等の組織分化が確認できた。

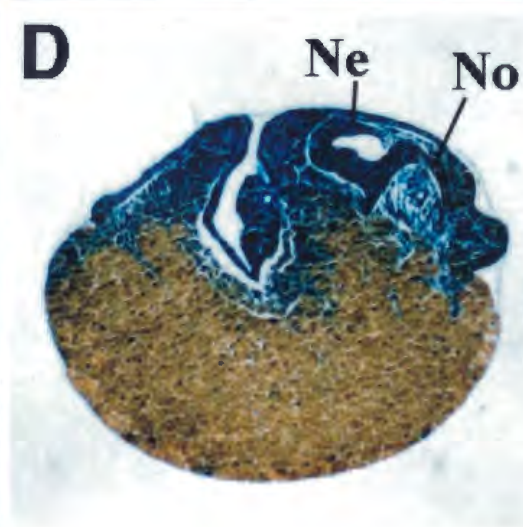
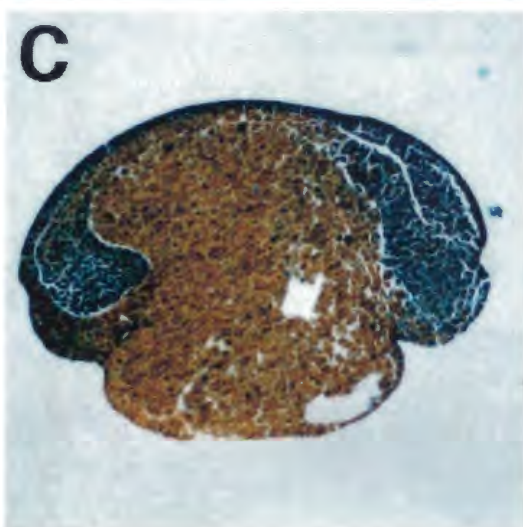
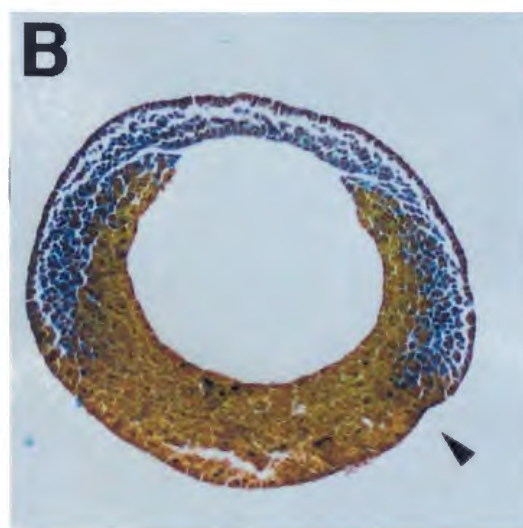
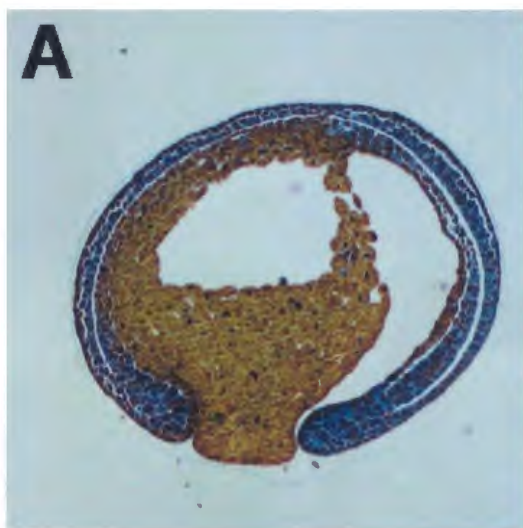


図 1 2、*cpg* 過剰発現胚のマーカー遺伝子の発現 (RT-PCR)

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、原腸胚期 (st.11 : A) と神経胚期 (st.23 : B) に RT-PCR によって各分化マーカー遺伝子の発現量を正常胚と比較した。 (A) *cpg* 過剰発現により、初期中胚葉マーカー遺伝子 (*Xbra*, *goosecoid*, *noggin*, *Xwnt-8*)、内中胚葉マーカー遺伝子 (*siamois*) の発現量は変化しなかった。 (B) *cpg* 過剰発現により、神経マーカー遺伝子 (*N-CAM* and *Otx-2*)、後期中胚葉マーカー遺伝子 (*MyoD* and *GATA-2*) の発現量は変化しなかった。 *Histone4* はインターナルコントロールとして用いた。

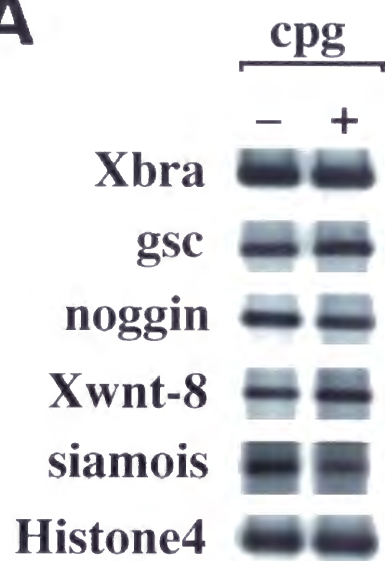
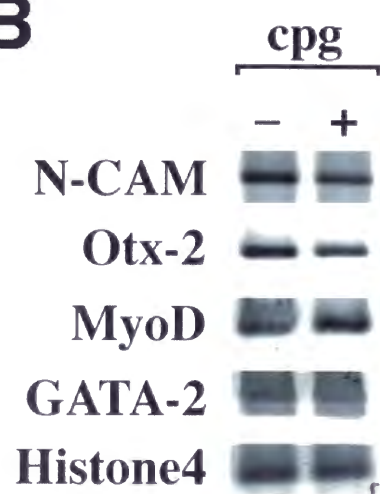
A**B**

図 1 3、*cpg* 過剰発現胚の SEM 像

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、原腸胚期 (st.11.5) に内部の形態を SEM によって観察した。(A) 動物極付近の外胚葉の細胞層は厚く、エピボリーの障害が見られた。(B) 動物極への中胚葉の移動は確認できたが、外胚葉と移動してきた中胚葉の境界は不明瞭であった。さらに側部の外胚葉の細胞層が薄いことが見られた。(C) 内胚葉は隙間が多く確認できた。(D) ボトル細胞の形成は正常であった。

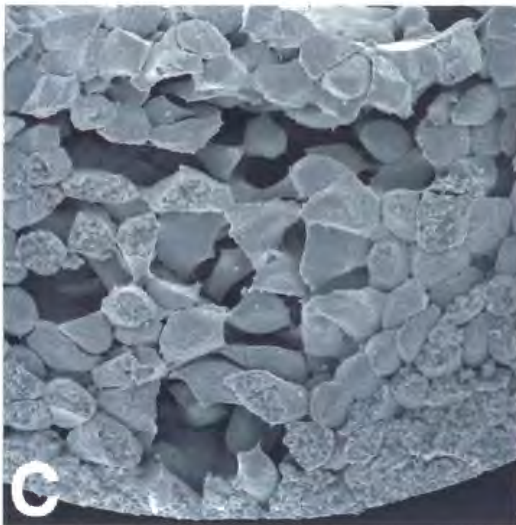
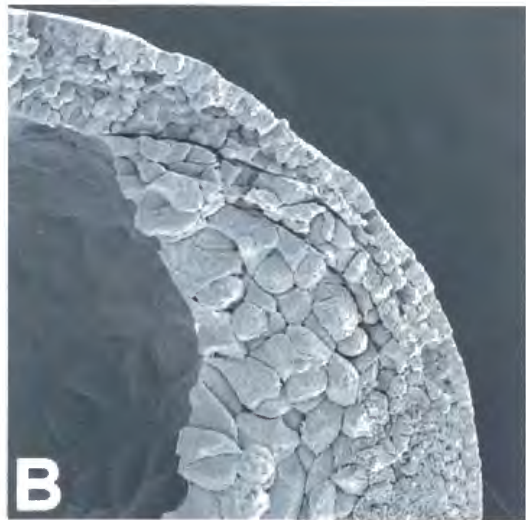
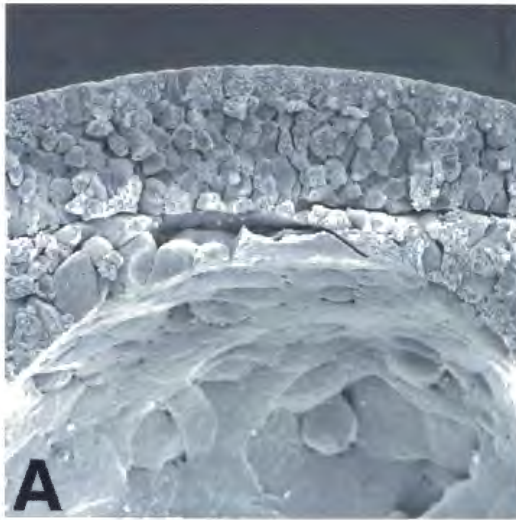


図 1 4、*cpg* 過剰発現胚の Keller サンドウィッチ塊の伸長反応

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、原腸胚期 (st.10) に Keller サンドウィッチ外植体を作成し、対照胚が神経胚期 (st.20) になった時の伸長の様子を観察した。(A) 正常胚の Keller サンドウィッチ外植体は伸長が見られた。(B) *cpg* 過剰発現によって伸長反応が阻害された。

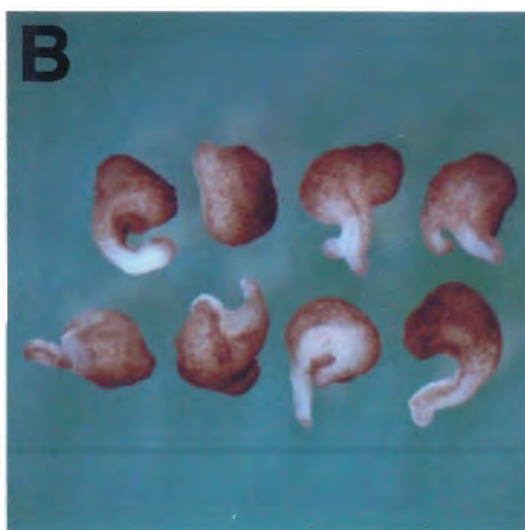


図 1 5、*cpg* 過剰発現胚の animal cap assays (1)

2 細胞期胚の両割球動物極に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、胞胚期 (st.8) に animal cap を切り出し、6 時間 10ng/ml の activin で処理し、対照胚が神経胚期 (st.20) になった時の伸長の様子を観察した。(A) 正常胚の animal cap は activin 処理によって伸長した。(B) *cpg* 過剰発現によって activin 処理による animal cap の伸長は著しく阻害された。

(C) 正常胚の animal cap は activin 処理しないと未分化な球状塊になった。(D) activin 処理をせずに、*cpg* を過剰発現しただけでは C と同様に未分化な球状塊となった。

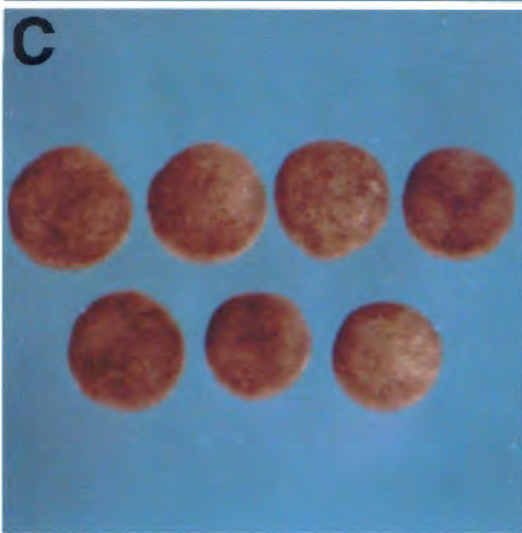
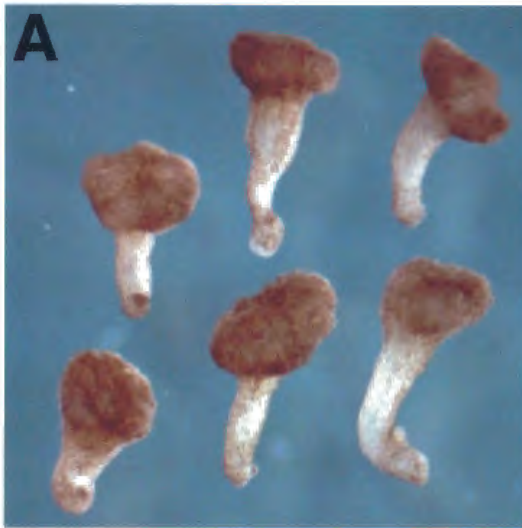


図 16、*cpg* 過剰発現胚の animal cap assays (2)

2細胞期胚の両割球動物極に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、胞胚期 (st.8) に animal cap を切り出し、6時間 10ng/ml の activin で処理し、対照胚が原腸胚期 (st.11) になった時に RT-PCR によってマーカー遺伝子の発現量を解析した。Em は全胚を示し、- は activin 未処理あるいは *cpg* mRNA の未注入を示し、+ は activin 処理あるいは *cpg* mRNA の注入を示す。(レーン 2、4) activin 処理によって誘導されるマーカー遺伝子 (*noggin*, *MyoD* and *Xbra*) の発現は *cpg* の過剰発現に影響を受けなかった。(レーン 3、5) *cpg* だけでは分化マーカー遺伝子の発現は誘導されなかった。*Histone4* はインターナルコントロールとして用いた。

	Em	AC				
activin	-	+	-	+	-	
cpg	-	-	-	+	+	
noggin						
MyoD						
Xbra						
Histone4						

図 17、*cpg* の convergent extension 運動を阻害する遺伝子への影響
2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、原腸胚期 (st.11) に *C-cadherin*、*PAPC* の発現量を RT-PCR によって解析した。*cpg* は *C-cadherin*、*PAPC* の発現に影響を与えなかった。 *Histone4* はインターナルコントロールとして用いた。

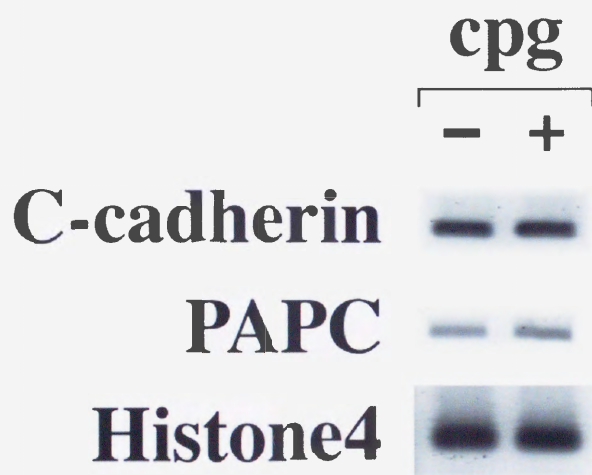


図 18、*cpg* の核内移行

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg-GFP* mRNA (1ng) を顕微注入し、胞胚初期 (st.8 : A、B) と胞胚後期 (st.9 : C、D) に蛍光顕微鏡で注入胚を観察した。(A、B) MBT 以前に *cpg-GFP* 蛋白質は核内に移行せず、細胞質中に広く存在していた。(C、D) MBT 以後に *cpg-GFP* 蛋白質は核内に移行した。

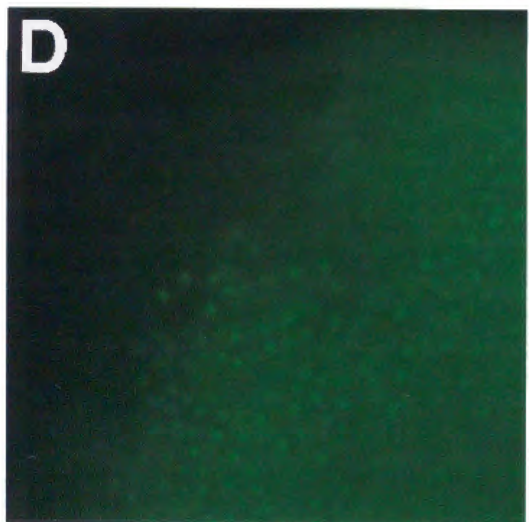
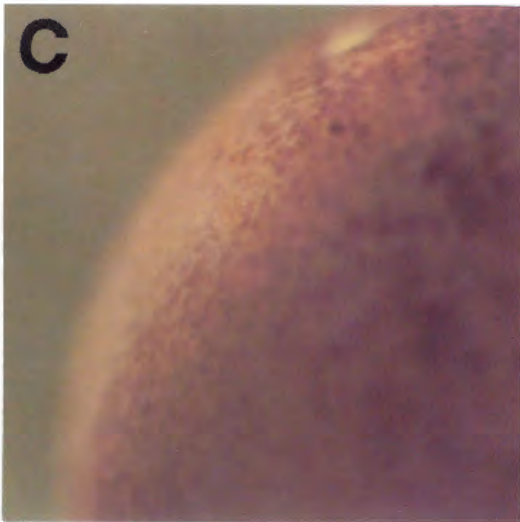
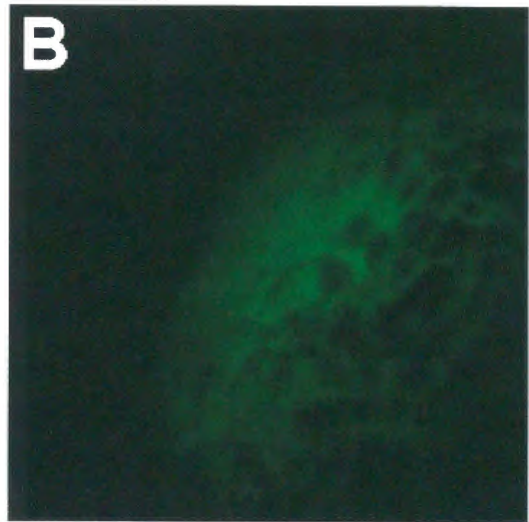
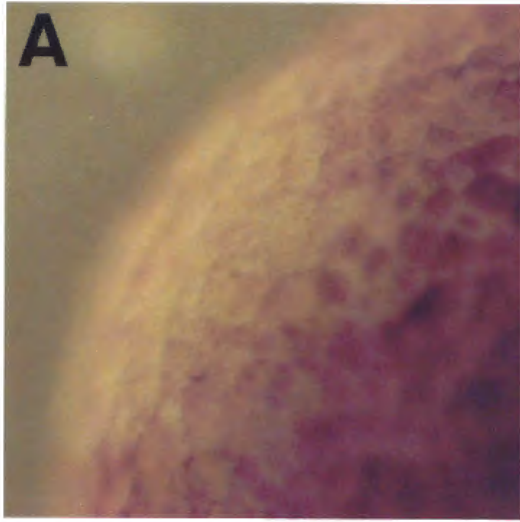


図 19、アフリカツメガエル *collagen type I alpha 1* のシーケンス
collagen type I alpha 1 は 1447a.a. (赤字) をコードしていた。3' 末端には
3 箇所の polyA signal site (緑字: AATAAA) が存在した。

[illegible]

図 20、collagen type I alpha 1 のアミノ酸のアライメント

アフリカツメガエル collagen type I alpha 1 はウシガエル (*Rana catesbeiana*)、イモリ (*Cynops pyrrhogaster*)、ニワトリ、ヒト、マウスの collagen type I alpha 1 と高い相同性を示した。ダッシュ (-) は一致したアミノ酸残基を示し、ドット (.) はギャップを示す。

Xenopus	COL1A1	MFSPVTR.TLLLIAATIL.....VARCQGEHVDQTSDCVQHGYITSNRDVKWPKDCQI	53
Rana	COL1A1	-----L-L-V-----K-----D-LGY-G-VD-R-NDK-----A-----	53
Cynops	COL1A1	-----N-L-V-----CV-----L-ADQ-IGS-----H-----G-----	53
Chicken	COL1A1	-----S-LL--IA-TVL-TRG..E.....E-I--GS--D-L-NDK-----P-----	53
Human	COL1A1	-----L-LL--A-TAL-THGQEQGVQDE-IPPIIT--N-LR-ND-----P-R-----	60
Mouse	COL1A1	-----L-LL--G-TAL-TH.....QE-IPEVS-IHN-LRVP-GET-----V-L-----	51
Xenopus	COL1A1	CVCDKSHILCDEVHCE..ADCFNFIIVGECPCVCTDNDA..QYSEVTGVGPKGDVGP	109
Rana	COL1A1	-----E-T-----I--I-G-----E-PM-----L.G.EG--QTGSV-----E-----	108
Cynops	COL1A1	-----M-D--T-G-YPV--AE-PP-----P..GDTS--C--D-----E-----	112
Chicken	COL1A1	-----S-----Y-I--PS--AE-PP-----I-P-V--SPV-P-SA-----T-----	112
Human	COL1A1	-----KV--D-I--ETKM--GAEVPE-----P-GSESPTDQ-T-----T-----	119
Mouse	COL1A1	-----I-H--TAV--D-Q..NKEEL--QRRE-G-AF-PEEYVSP..N--DV-----GP-----	109
Xenopus	COL1A1	KGDKGIAGPPGRDGIPIGQ..PGIPIGPQPPGPPGLGQNFAPQMSYGYDEKS..AGISMPG	165
Rana	COL1A1	-----R-ER-PP-A-----G--A-----	164
Cynops	COL1A1	-----R-LP-----..N-----L--G-----	165
Chicken	COL1A1	-----R-R-LP-----PGL--P--G-----L-----VAV-----	168
Human	COL1A1	-----R-PR-P-----PGL--P--G-----L-----TG-V-----	179
Mouse	COL1A1	-----Q-PR-PV-----PGL--P--G-----S-----V-V-----	168
Xenopus	COL1A1	PMGPMGPPGPPGPGSGPGQFGQPGPGEPGSGAGMGPGRSSGPPGKMGDEKAGKGP	225
Rana	COL1A1	-----S-----A--PP-----LP-----D--S-----	224
Cynops	COL1A1	-----A--L-----P-----P-----D-----	225
Chicken	COL1A1	-----S--L--P-A-----P-----PP-----D-----	239
Human	COL1A1	-----S--L--P-A-----G--P-----PP-----D-----	228
Mouse	COL1A1	-----S--L--P-A-----G--P-----PP-----D-----	228
Xenopus	COL1A1	RPGERGPPGPGQARGLGTAGLPGMKHGRFNGLDGAKGDSGPAGPKGEPGSGENGAPG	285
Rana	COL1A1	-----S-----S-----N-----N-----	284
Cynops	COL1A1	-----Q-----S-----A-----A-----	285
Chicken	COL1A1	-----Q-----S-----A-----A-----	288
Human	COL1A1	-----Q-----S-----A-----A-----	299
Mouse	COL1A1	-----Q-----S-----A-----A-----	288
Xenopus	COL1A1	CVGPRGLSGERGRFPSPGPGAGARGNDGAPGAAGPPGSGTSPSPGPPGPGGVGPKGDAGPQG	345
Rana	COL1A1	-----P-----T-----P-----S-----T-----	344
Cynops	COL1A1	-----M-----P-----AP-----S-----P-----T-----A-A-----ET-----	345
Chicken	COL1A1	-----M-----P-----AP-----S-----P-----T-----A-A-----ET-----	348
Human	COL1A1	-----M-----P-----AP-----S-----P-----T-----A-A-----ET-----	359
Mouse	COL1A1	-----M-----P-----P-----T-----V-----P-----T-----A-A-----E-----	348
Xenopus	COL1A1	SRGSDGPGGGRGEPGAPGQAGAAAGPSGHPGSGDGPGAKGATGAPGAGAPGPPGARGAGG	404
Rana	COL1A1	-----P-----A-----P-----SA-----T-----G-----S-----	404
Cynops	COL1A1	-----E-----A-----P-----P-----T-----G-----S-----	405
Chicken	COL1A1	-----A-----E-----S-----P-----P-----A-----A-----PS-----	408
Human	COL1A1	-----P-----E-----V-----P-----P-----H-----A-----T-----	419
Mouse	COL1A1	-----A-----E-----V-----P-----P-----A-----A-----N-----PS-----	408
Xenopus	COL1A1	AQGGPGSGPGKGNHGPDAQGNKGAGAGGEPGAGVQGGPPGSGEKGKSGRGP..PAG	464
Rana	COL1A1	-----P-----A-----S-----P-----S-----P-----P-----AP-----	464
Cynops	COL1A1	-----P-----A-----A-----S-----P-----S-----P-----P-----G-----	465
Chicken	COL1A1	-----P-----S-----A-----S-----P-----DT-----A-----A-----G-----	468
Human	COL1A1	-----P-----S-----P-----S-----P-----DT-----A-----A-----G-----	459
Mouse	COL1A1	-----P-----S-----P-----S-----P-----DT-----AT-----A-----A-----G-----	468
Xenopus	COL1A1	PPGAGRGPGGSRGFPGSGDASGPKGAPGERGVPVAGPKGSGESRPGEPGLPGAGK	524
Rana	COL1A1	-----A-----A-----G-----P-----S-----P-----P-----AP-----	524
Cynops	COL1A1	-----L-----A-----A-----IA-----P-----SP-AV-----P-----A-----A-----	525
Chicken	COL1A1	-----L-----P-----A-----VA-----PA-----P-----A-----A-----	528
Human	COL1A1	-----L-----P-----A-----VA-----PS-----AF-----P-----A-----A-----	539
Mouse	COL1A1	-----L-----P-----A-----VA-----PS-----AF-----P-----A-----A-----	528
Xenopus	COL1A1	LTGSPGSGSGDKTGFAGAPQDGRAGPPGPGARQSGVHGFPFGKGAAGEPGKNGEKG	584
Rana	COL1A1	-----P-----P-----D-----P-----S-----P-----R-----	584
Cynops	COL1A1	-----P-----P-----A-----HP-----S-----S-----R-----	585
Chicken	COL1A1	-----P-----P-----P-----PA-----P-----A-----A-----R-----	588
Human	COL1A1	-----P-----P-----P-----PA-----P-----A-----A-----R-----	599
Mouse	COL1A1	-----P-----P-----P-----PA-----P-----A-----A-----R-----	588
Xenopus	COL1A1	VAGPPGAVGLPGKDGAGQPPGPPGAPGAGERGQGFAGPGFGLGSPGAGESGKPG	644
Rana	COL1A1	-----T-----A-----E-----S-----S-----S-----A-----	644
Cynops	COL1A1	-----AP-----AA-----E-----T-----A-----PA-----P-----A-----	645
Chicken	COL1A1	-----P-----PA-----E-----E-----S-----PA-----P-----A-----	648
Human	COL1A1	-----L-----PA-----E-----A-----S-----PA-----P-----A-----	659
Mouse	COL1A1	-----L-----PA-----E-----A-----S-----PA-----P-----A-----	648
Xenopus	COL1A1	EQGVPGDVGPGSGPAGARGSGFPGKRGAGQGGPGGQAGSGAGPNDGAKGAGAGAGP	704
Rana	COL1A1	-----A-----A-----GP-----S-----P-----G-----A-----A-----P-----S-----	704
Cynops	COL1A1	-----A-----A-----GP-----S-----P-----G-----A-----A-----P-----S-----	705
Chicken	COL1A1	-----L-----AP-----S-----V-----P-----A-----P-----D-----P-----	708
Human	COL1A1	-----L-----AP-----S-----V-----P-----A-----P-----D-----P-----	719
Mouse	COL1A1	-----L-----AP-----S-----V-----P-----A-----P-----D-----P-----	708
Xenopus	COL1A1	QQGSPGLQGNPGERSSGLPGAKGDRSGDQGVKSSDGTGKDGVRGLTGPIGPPGPGGAGP	764
Rana	COL1A1	-----PS-----AG-----I-----P-----A-----A-----S-----	764
Cynops	COL1A1	-----R-----P-----E-----A-----M-----A-----T-----A-----A-----S-----	765
Chicken	COL1A1	-----ME-----P-----E-----AA-----P-----P-----A-----A-----L-----	768
Human	COL1A1	-----S-----A-----AA-----P-----A-----P-----A-----S-----	779
Mouse	COL1A1	-----S-----A-----AA-----P-----A-----P-----A-----S-----	768

Xenopus	COL1A1	DKGEAGPAGPAGPTGARGAPGERGEPAPPGPAGFAGPFGADGQPGAKGEQSGSAGKGDAG	824
Rana	COL1A1	-----S-----S-----G-----S-----G-----A-----P-----	824
Cynops	COL1A1	-----P-----S-----S-----G-----TC-----S-----A-----P-----	825
Chicken	COL1A1	-----P-----P-----D-----G-----S-----T-----A-----P-----	828
Human	COL1A1	-----S-----S-----D-----G-----S-----T-----A-----P-----	839
Mouse	COL1A1	-----S-----P-----D-----AG-----S-----T-----V-----	828
Xenopus	COL1A1	PSGLPGPTGAPGAGALGSPGPKGARGAPGPGATGFFGAAGRVPFGPFGNAGFPFGSG	884
Rana	COL1A1	-----P-----AA-----V-----AT-----PA-----S-----	884
Cynops	COL1A1	-----AP-----PA-----SV-----A-----T-----A-----L-----P-----	885
Chicken	COL1A1	-----P-----PA-----IV-----A-----SA-----I-----L-----P-----	888
Human	COL1A1	-----P-----PA-----A-----P-----I-----RV-----A-----SA-----P-----	899
Mouse	COL1A1	-----P-----PA-----A-----P-----I-----RV-----A-----SA-----P-----	888
Xenopus	COL1A1	PAGKEGAGFRGRTGTPAGRSGEFGAAGPFGPGKSGSGSDGAPAGPFGPQGVAGSG	944
Rana	COL1A1	-----Q-----S-----P-----S-----S-----A-----I-----T-----	944
Cynops	COL1A1	-----G-----S-----S-----P-----S-----I-----Q-----	945
Chicken	COL1A1	-----E-----S-----P-----P-----A-----I-----T-----I-----Q-----	948
Human	COL1A1	-----G-----S-----P-----V-----PP-----A-----A-----S-----T-----I-----Q-----	959
Mouse	COL1A1	-----V-----G-----P-----V-----PP-----A-----A-----S-----T-----I-----Q-----	948
Xenopus	COL1A1	TVGLPGMRGERGFSGLPGPAGFPGKQSSSGSGERGPFGPGLGPPGSGRGAAG	1004
Rana	COL1A1	-----Q-----P-----P-----P-----P-----A-----P-----S-----	1004
Cynops	COL1A1	-----V-----Q-----P-----P-----P-----N-----P-----S-----	1005
Chicken	COL1A1	-----V-----Q-----P-----P-----P-----A-----N-----A-----P-----	1008
Human	COL1A1	-----V-----Q-----P-----P-----P-----S-----M-----A-----P-----	1019
Mouse	COL1A1	-----V-----Q-----P-----P-----P-----S-----M-----A-----P-----	1008
Xenopus	COL1A1	SEGAPGRDGAVGPKGDRGE..AAGPPGAPGAPGAPGVPAGKSGDRGRTGSPGAPAG	1062
Rana	COL1A1	-----S-----SA-----SGP-----P-----G-----N-----A-----	1064
Cynops	COL1A1	-----S-----SP-----MGPS-----P-----N-----A-----	1065
Chicken	COL1A1	-----A-----S-----A-----TGP-----P-----N-----A-----P-----	1068
Human	COL1A1	-----A-----S-----SP-----A-----TGP-----P-----N-----A-----P-----	1079
Mouse	COL1A1	-----A-----S-----P-----A-----TGP-----P-----N-----A-----I-----	1068
Xenopus	COL1A1	TAGARGPAGPQGRGDKKEAGEQGERGMKGRGFGNPGSGPPGSGEQSPGASGAPAG	1122
Rana	COL1A1	-----P-----S-----A-----A-----DLF-----A-----HA-----	1124
Cynops	COL1A1	-----PS-----V-----AP-----A-----A-----MQ-----AP-----P-----	1125
Chicken	COL1A1	-----P-----S-----V-----AP-----A-----A-----MQ-----AP-----P-----	1128
Human	COL1A1	-----P-----S-----V-----AP-----A-----A-----MQ-----AP-----P-----	1139
Mouse	COL1A1	-----P-----S-----V-----AP-----A-----A-----MQ-----AP-----P-----	1128
Xenopus	COL1A1	PRGPPGSSGNPKDGSWGLPGLIGPFGPRGTGDTVGAPGPGF..GPPGPPGSGGGFDFS	1181
Rana	COL1A1	-----P-----S-----P-----P-----P-----A-----PP-----	1184
Cynops	COL1A1	-----P-----ST-----V-----P-----N-----P-----PPS-----	1185
Chicken	COL1A1	-----P-----A-----AA-----L-----P-----E-----V-----P-----PPS-----	1188
Human	COL1A1	-----P-----A-----A-----L-----P-----E-----V-----P-----PPSA-----	1189
Mouse	COL1A1	-----P-----A-----S-----L-----P-----E-----V-----P-----PPS-----Y-----	1188
Xenopus	COL1A1	FNFQFPQEKSHD..GRFYRADDAVNRDRLEVDSTLKSLSKQIEMISPEGTAKKNPARTC	1240
Rana	COL1A1	-----P-----H-----D-----DE-----H-----T-----R-----	1240
Cynops	COL1A1	-----EP-----GD-----YF-----V-----T-----A-----R-----	1245
Chicken	COL1A1	-----L-----A-----G-----Y-----V-----T-----Q-----R-----	1248
Human	COL1A1	-----L-----A-----G-----Y-----V-----T-----Q-----R-----	1259
Mouse	COL1A1	-----L-----Q-----GD-----Y-----V-----A-----A-----Q-----SR-----	1248
Xenopus	COL1A1	RDLMCHSDWKSGEYWDPNQICILLDAIKVYCNMETGETCIYPTQSSIPQKSWYTSKWL	1300
Rana	COL1A1	-----P-----H-----D-----DE-----H-----T-----R-----	1300
Cynops	COL1A1	-----G-----D-----N-----H-----V-----S-----A-----S-----N-----P-----	1305
Chicken	COL1A1	-----G-----D-----N-----H-----V-----AT-----A-----N-----L-----PK-----	1308
Human	COL1A1	-----G-----D-----N-----H-----V-----AT-----A-----N-----L-----PK-----	1319
Mouse	COL1A1	-----G-----D-----N-----H-----V-----AT-----A-----N-----L-----PK-----	1308
Xenopus	COL1A1	EKKHVVFGEMSDGFGFYEGSGSSADVTIQLTFLRLMATEASQNTIYHCKNSVAYMDQ	1360
Rana	COL1A1	-----T-----H-----D-----DE-----H-----T-----R-----	1360
Cynops	COL1A1	-----T-----T-----G-----DE-----N-----S-----T-----V-----H-----	1365
Chicken	COL1A1	-----T-----T-----G-----DE-----N-----S-----T-----V-----H-----	1368
Human	COL1A1	-----D-----R-----S-----T-----GQ-----DE-----A-----S-----T-----V-----	1379
Mouse	COL1A1	-----S-----T-----P-----DPT-----A-----S-----T-----V-----	1368
Xenopus	COL1A1	ATGNLKKALLQGSNEIIRAEGRNSRFTYSVVDGCTQHTQEWGKTVIDYKTKTSRLPI	1420
Rana	COL1A1	-----E-----V-----G-----T-----Q-----E-----P-----	1420
Cynops	COL1A1	-----E-----V-----G-----T-----Q-----E-----P-----	1425
Chicken	COL1A1	-----D-----V-----A-----G-----T-----S-----A-----E-----	1428
Human	COL1A1	-----Q-----K-----K-----TV-----S-----A-----E-----	1439
Mouse	COL1A1	-----Q-----K-----K-----TV-----S-----A-----E-----	1428
Xenopus	COL1A1	TDVAPMDIGAPDQEFQGDIGIPVCFV	1447
Rana	COL1A1	-----I-----V-----T-----V-----L-----	1445
Cynops	COL1A1	-----I-----V-----T-----V-----L-----	1450
Chicken	COL1A1	-----I-----L-----V-----V-----L-----	1453
Human	COL1A1	-----I-----L-----V-----V-----L-----	1464
Mouse	COL1A1	-----I-----L-----V-----V-----L-----	1453

図 2 1、*collagen type I alpha 1* の時間的発現 (RT-PCR)

各発生段階の胚から抽出した 1 μ g の全 RNA を用いて RT-PCR を行った。
collagen type I alpha 1 は神経胚期 (st.20) 以後に急激に発現量が増加した。
Histone4 はインターナルコントロールとして用いた。

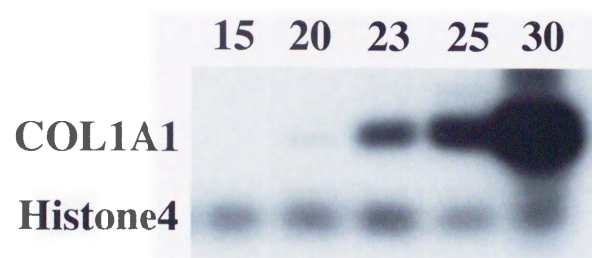


図 2 2、*collagen type I alpha 1* の空間的発現 (whole mount *in situ* hybridization)

(A) 尾芽胚期 (st.25) に *collagen type I alpha 1* は最初に胚の背側後方から発現が検出された。(B) st.28 には前方部へ発現が広がっていった。(C) st.30 には発現域が頭部に至った。A-C は側面。(D-G) C の胚の 1 (D、F)、2 (E、G) の横断面での切片。F は D の、G は E の拡大図。(D、F) 胚の頭部では腹側の表皮まで発現が広がっていた。(E、G) 胚の後方部では背側表皮の内層に強く発現し、背側表皮の外層や真皮節にも発現していた。スケールバーは (A-C) 1 mm、(D-F) 20 μm 、(G) 10 μm 。

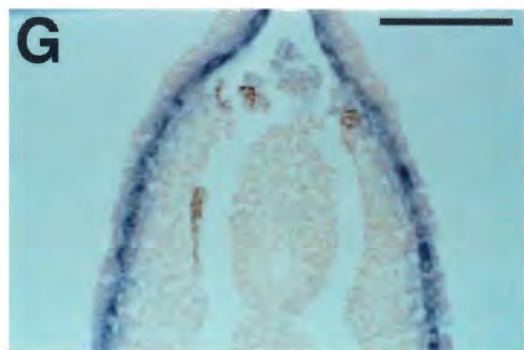
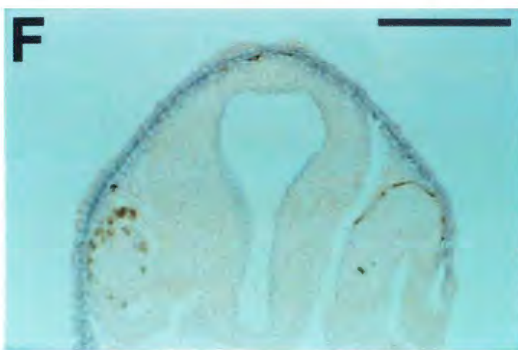
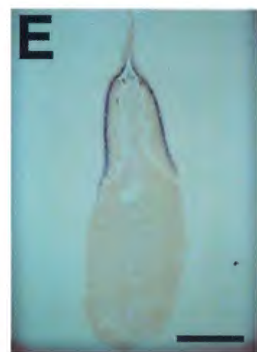
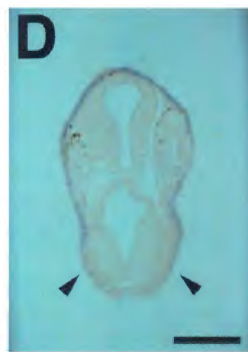
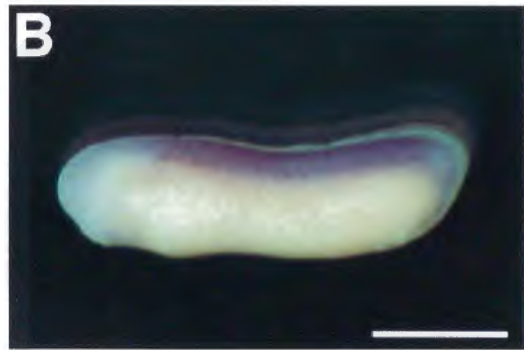
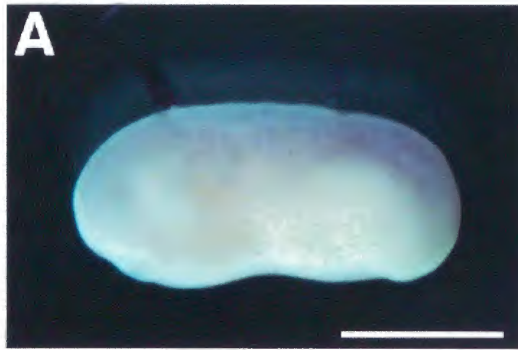


図 2 3、*collagen type I alpha 1* の空間的発現 (RT-PCR)

神経胚期 (st.20) 以後の胚を前後軸の中央で半分に分け、前方部 (A) と後方部 (B) での発現量を **RT-PCR** によって比較した。神経胚期以後の何れのステージでも前方部より後方部での発現量が多かった。

Histone4 はインターナルコントロールとして用いた。

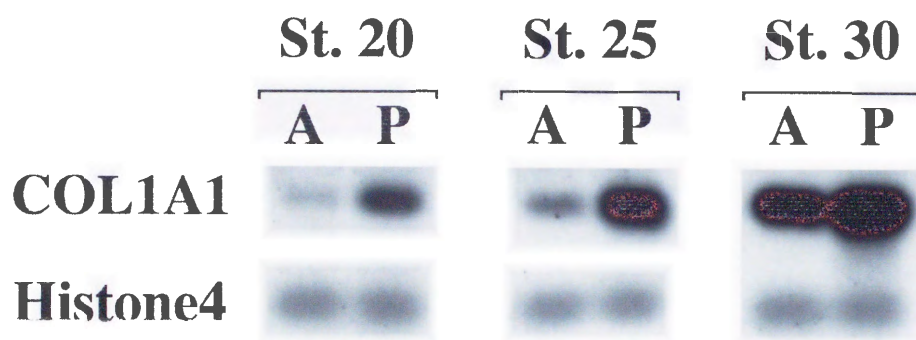


図 2 4、*cpg* 過剰発現による *fibronectin* への影響 (RT-PCR)

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、原腸胚期 (st.11) に RT-PCR によって *fibronectin* の発現量を調べた。原腸胚期において *cpg* は *fibronectin* の発現量に影響を及ぼさなかった。 *Histone4* はインターナルコントロールとして用いた。

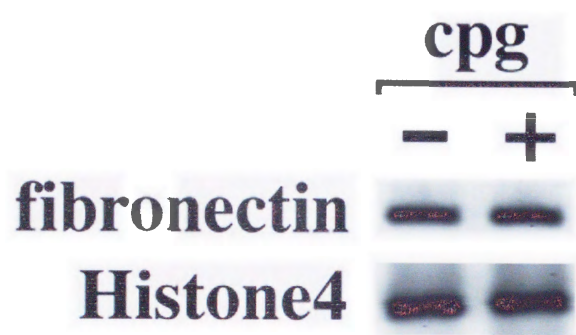


図 25、*cpg* 過剰発現による *fibronectin* への影響（ルシフェラーゼ活性）
2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA（1ng）と *fibronectin* のルシフェラーゼリポーター遺伝子（25pg）を顕微注入し、原腸胚期（st.12）にルシフェラーゼ活性を測定した。*cpg* 過剰発現胚ではルシフェラーゼ活性が低下しており、*cpg* が *fibronectin* リポーター遺伝子の転写量を抑制した。

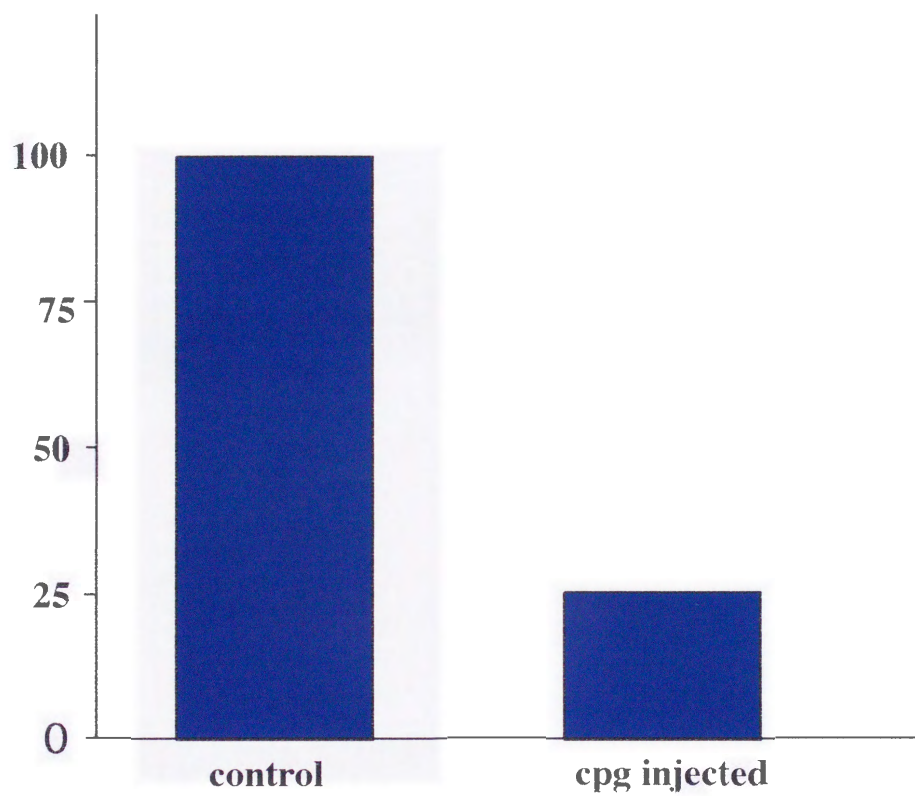


図 2 6、*cpg* の機能ドメインの解析 (1)

2細胞期胚の両割球帯域に各コンストラクト mRNA (1ng) を顕微注入し、尾芽胚期に胚の形態を観察した。また、各コンストラクト mRNA (1ng) と *fibronectin* リポーター遺伝子 (25pg) を顕微注入し、原腸胚期 (st.12) にルシフェラーゼ活性を測定した。

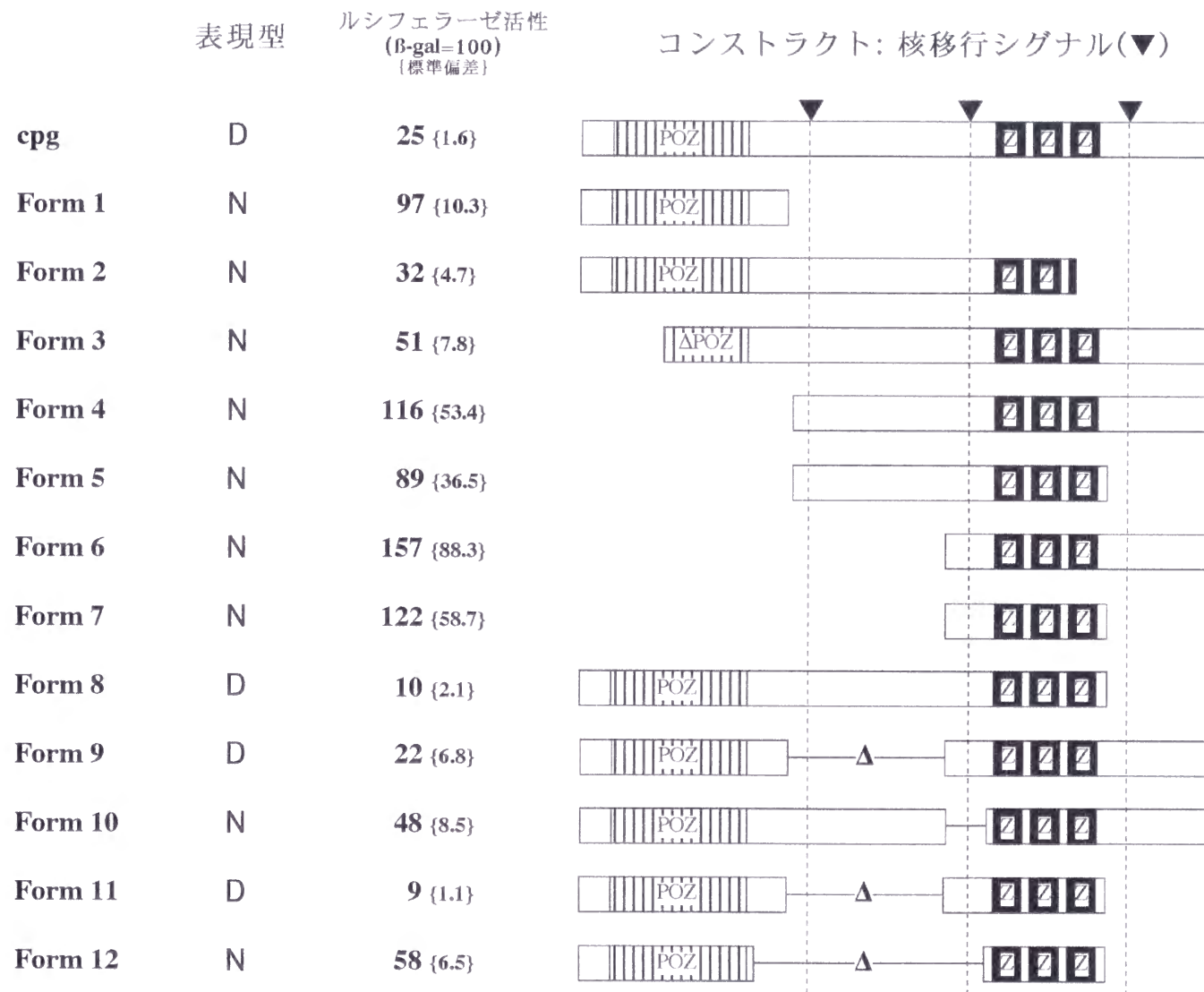


図 2 7、*cpg* の機能ドメインの解析 (2)

2 細胞期胚の両割球帯域に *Form 10*、*Form 11* と *GFP* の融合 mRNA (*Form 10-GFP*、*Form 11-GFP*) (1ng) を顕微注入し、原腸胚期 (st.11) に animal cap を一部切除し、蛍光顕微鏡で観察した。 (A) *Form 10-GFP* の蛍光シグナルは主に細胞質中に広がっていた。 (B) *Form 11-GFP* の蛍光シグナルは強く核内に移行していた。

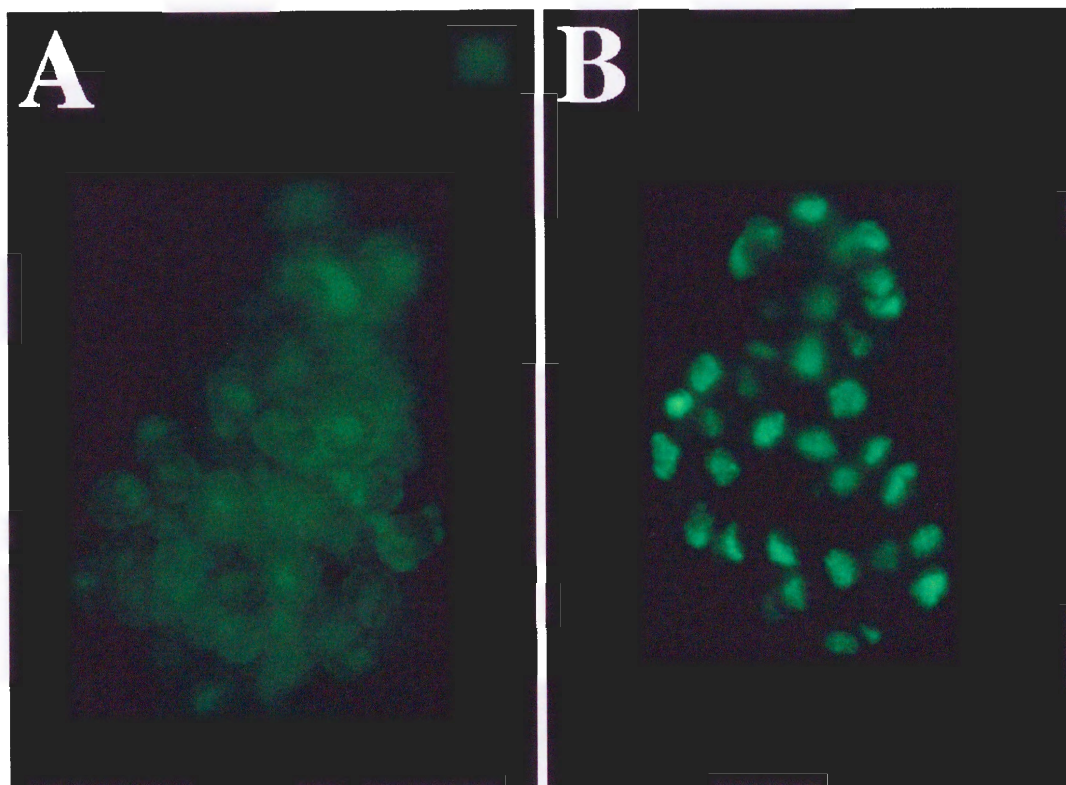


表 1、原腸陥入阻害への *cpg* の濃度依存的効果

2細胞期胚の両割球帯域に *cpg* mRNA (250pg-1ng) を顕微注入し、尾芽胚期に胚の形態を観察し、陥入阻害が弱かった胚 (形態は図 9D) と強かった胚 (形態は図 9F) に分類した。*cpg* mRNA の濃度が高いほど、陥入阻害効果は強くなった。コントロールとして β -*gal* mRNA を用いた。

表1. 原腸陥入阻害へのcpgの濃度依存的効果

注入した mRNAの種類	濃度 (/割球)	陥入阻害効果の 強かった胚	陥入阻害効果の 弱かった胚	正常胚
cpg	1ng n=82	90%	9%	1%
	500pg n=92	87%	12%	1%
	250pg n=93	36%	47%	17%
β-gal	1ng	0%	0%	100%

表 2、原腸陥入阻害への *cpg* の注入領域の特異性

2細胞期胚の両割球の動物極、帯域、植物極に *cpg* mRNA (1ng) を顕微注入し、尾芽胚期に胚の形態を観察し、注入領域の違いによる陥入阻害効果を調べた。陥入阻害が弱かった胚（形態は図 9D）と強かった胚（形態は図 9F）に分類した。帯域への顕微注入によって最も強く陥入阻害が起こることが分かった。

表2. 原腸陥入阻害へのcpgの注入領域の特異性

注入領域		陥入阻害効果の 強かった胚	陥入阻害効果の 弱かった胚	正常胚
2細胞期胚	動物極 n=124	23%	35%	42%
	帯域 n=96	83%	17%	0%
	植物極 n=109	45%	32%	23%

添付論文

Title

A novel POZ/zinc finger protein, *champignon*, interferes with the convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus*

Authors

Toshiyasu Goto^{1*}, Kouichi Hasegawa², Tsutomu Kinoshita² and Hiroshi Y. Kubota¹

¹Department of Zoology, Graduate School of Science, Kyoto University, Sakyo-Ku, Kyoto 606-8502, Japan

²Developmental Biology, Faculty of Science, Kwansei Gakuin University, Nishinomiya 662-8501, Japan

***Address to correspondence**

Toshiyasu Goto

Department of Zoology, Graduate School of Science, Kyoto University, Sakyo-Ku, Kyoto 606-8502, Japan

Tel: +81-75-753-4082

Fax: +81-75-753-4080

E-mail: goto@develop.zool.kyoto-u.ac.jp

Short Title

Xenopus POZ/zinc finger gene *champignon*

Key words

Xenopus, gastrulation, convergent extension, *champignon*, transcription factor, POZ domain, zinc finger

Text 29 pages, 2 tables and 8 figures.

SUMMARY

We have cloned a krüppel-like transcription factor that encodes an N-terminal POZ domain and three C-terminal zinc fingers of the C₂H₂ type by expression cloning. Overexpression of mRNA by microinjection in the early cleavage stage embryos of *Xenopus* resulted in interference with gastrulation. As the injected embryo looks like a mushroom in appearance at the neurula stage, we have named this gene *champignon* (*cpg*). *cpg* was expressed maternally and *cpg*-GFP fusion protein was localized into the nuclei after the midblastula transition. Zygotic expression of *cpg* was increased after the onset of gastrulation and became localized in the anterior region, especially in the cement gland after the neurula stage. In the *cpg*-injected embryos, the blastopore appeared normally, but regressed thereafter. The injected embryos then elongated along the primary dorso-ventral axis during the tailbud stage. Histological sections and RT-PCR analysis of various marker genes showed that *cpg* had no effect on the cell growth and differentiation. Observations by scanning electron microscopy showed that the early step of epiboly of the animal cap was defective. However, the deep mesoderm migrated towards the animal pole region. Neither Keller-sandwich explants nor activin-treated animal cap explants excised from *cpg*-injected embryos elongated. These results suggest that *cpg* regulates the expression of the genes which are required for the convergent extension movements during gastrulation.

INTRODUCTION

In *Xenopus* early development, gastrulation involves very complicated changes in cell morphology. The morphogenetic movements during gastrulation involve formation of the bottle cells, epiboly of the animal cap, migration of the deep mesoderm along the blastocoel roof, and convergent extension of the noninvoluting and involuting marginal cells. (Keller, 1980; Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Hardin and Keller, 1988; Keller and Tibbetts, 1989; Wilson and Keller, 1991; Keller and Jansa, 1992; Keller et al, 1992; Shih and Keller, 1992a, b). Although the bottle cells may play a role in orienting the direction of involution, they are not essential for gastrulation to continue, because the removal of the bottle cells after their formation did not interfere with the involution of the marginal zone and closure of the blastopore (Keller, 1981). Similarly, neither epiboly of the animal cap nor migration of mesoderm along the inner surface of the blastopore are essential for involution of the marginal zones and closure of the blastopore, because the removal of the blastocoel roof, including the animal cap and the noninvoluting marginal zone, did not inhibit the involution of the marginal zone and closure of the blastopore (Keller and Jansa, 1992). When the dorsal sectors of the early gastrula embryos were excised and cultured in sandwich, they showed convergent and extension movement autonomously and mimicked the normal process of gastrulation (Keller, 1991). Thus convergent extension movement of the marginal cells is thought to play a major role in gastrulation.

Although the mechanism of gastrulation has been investigated extensively at a cellular level, as described above, information on the molecular mechanism of gastrulation is limited. When deep mesodermal cells migrate along the inner surface of the blastocoel roof, they attach to the extracellular matrix on the inner surface of the blastocoel roof. The adhesive glycoprotein fibronectin is one of the major components of the network of the extracellular matrix (Lee et al., 1984). Inhibition of cellular attachment to fibronectin by a synthetic peptide for the cell-binding fragment of fibronectin leads to the arrest of

gastrulation (Boucaut et al., 1984; Winklbauer, 1990; Ramos and DeSimone, 1996; Ramos et al., 1996; Winklbauer and Keller, 1996). Some molecules related to the convergent extension movements have also been isolated. C-cadherin mediated cell-cell adhesion is associated with convergent extension movement during gastrulation. (Lee and Gumbiner, 1995; Zhong et al., 1999). Overexpression of *Xcadherin-11* leads to posteriorised phenotypes due to the inhibition of convergent extension movement (Hadeball et al., 1998). Paraxial protocadherin plays an important role in the convergent extension (Kim et al., 1998). The elimination of some sulfates also inhibits the convergent extension movements (Wallingford et al., 1997). In the present study we have cloned a novel krüppel-like transcription factor that encodes an N-terminal POZ domain and three C-terminal zinc fingers of the C₂H₂ type by the expression cloning. We suggest that this transcription factor plays an essential role in the convergent extension movement by controlling the target genes required for cellular rearrangement.

MATERIALS AND METHODS

Eggs and embryos

Eggs were obtained by injecting *Xenopus laevis* females with 400 units of human chorionic gonadotropin and were fertilized in vitro. Embryos were dejellied with sodium thioglycollate and cultured in modified Steinberg's Solution (MSS).

Developmental stages were determined according to Nieuwkoop and Faber (1967).

Construction of cDNA libraries and expression screening

Total RNA was isolated by the ultracentrifuge method using CsTFA (Pharmacia) (Okayama et al., 1987) or the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987) from embryos at various stages and mRNA was purified using polyAtract mRNA Isolation System (Promega). Double-stranded cDNAs were obtained from the purified mRNA using a ZAP-expression cDNA synthesis kit (Stratagene) and cloned into pCS2+ vector digested with *Eco*RI and *Xho*I. The plasmids were transformed into *E. coli* XL-1Blue-MRF' and plated onto LB-ampicillin plates so that each plate contained approximately 100 individual colonies. The colonies of each plate were scraped and grown in liquid cultures for plasmid isolation using the alkaline lysis method. Pools of the plasmids were linearized with *Not*I and used as DNA templates for capped mRNA synthesis using SP6 RNA polymerase. A total of 1 ng of the synthetic mRNA was microinjected into two blastomeres of a 2-cell embryo or two dorsal or ventral blastomeres of a 4-cell embryo and screened by morphogenesis after gastrulation. Two subsequent rounds of sib selection were performed to isolate a cDNA which caused gross changes in morphogenesis.

RT-PCR analysis

Oligo(dT)-primed first strand cDNA was prepared from 1 μ g of total RNA using

Superscript II (Gibco). One-twentieth of the cDNA obtained was used for each PCR. As an internal loading control, the primers for the ubiquitously expressed *Histone4* were included in all PCRs. Aliquots containing one-tenth of the PCR products were loaded on 2% agarose gels, electrophoresed, and transferred to nylon membrane. The membranes were hybridized to the random-primed isotope-labeled fragment of each gene and autoradiographed. The sequences of gene primers used were as follows: *cpg* forward 5'-AAGCCTGGGCTACGAGACAT-3', reverse 5'-TCATGGAGAGAGGCACATCG-3'; *Histone4* forward 5'-CGGGATAACATTCAGGGTATCACT-3', reverse 5'-ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT-3'; *Xbra* (Genbank accession number: M77243) forward (nt 432-451), reverse (nt 733-714); *gooseoid* (M81481) forward (nt 430-447), reverse (nt 917-900); *noggin* (M98807) forward (nt 995-1012), reverse (nt 1275-1258); *Xwnt-8* (X57234) forward (nt 1126-1143), reverse (nt 1457-1440); *siamois* (Z48606) forward (nt 539-560), reverse (nt 848-827); *N-CAM* (M25696) forward (nt 2817-2834), reverse (nt 3159-3142); *Otx-2* (U19813) forward (nt 770-791), reverse (nt 1108-1087); *MyoD* (X16106) forward (nt 221-240), reverse (nt 512-493); *GATA-2* (M76564) forward (nt 982-1001), reverse (nt 1400-1381); *C-cadherin* (U04707) forward (nt 1372-1391), reverse (nt 1814-1795); *PAPC* (AF042192) forward (nt 2490-2509), reverse (nt 2955-2936); fibronectin (M77820) forward (nt 7144-7163), reverse (nt 7543-7524); *Xenopus COL1A1* (AB034701) forward (nt 3396-3415), reverse (nt 3845-3826).

Whole mount in situ hybridization

In situ hybridization was performed using digoxigenin-labeled RNA probe and alkaline phosphatase substrate (NBT) (Boehringer Mannheim) according to Harland (1991). The pCS2+ vector including the cDNA of *cpg* was linearized with *EcoRI* and transcribed with T7 RNA polymerase to produce the antisense probe.

Histology and scanning electron microscopy

For histology, embryos were fixed overnight in a solution of 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), dehydrated through a graded series of ethanol, cleared by xylene, and embedded in paraffin (Paraplast Plus, Sigma). Ten- μ m thick sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in a graded series of ethanol, and stained with 0.1% azocarmine B for 20 sec and a mixture of 0.2% aniline blue and 0.4% orange G for 7 min.

For the SEM study, the embryos were fixed overnight in a solution of 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5). The fixed embryos were cut in half at the midsagittal plane using a razor blade, and then postfixed with 1% OsO₄ in 0.1 M phosphate buffer. The samples were dehydrated through a graded series of acetone, and critical point dried by using liquid CO₂.

Animal cap assay and Keller sandwich experiment

A total of 1 ng of *cpg* mRNA was microinjected into the equatorial region of two blastomeres of the 2-cell embryo for Keller sandwich experiments or into the animal pole region of two blastomeres of the 2-cell embryo for animal cap assays. Keller sandwich experiments were performed according to previously described methods (Keller, 1991). Animal caps were excised from stage 8 embryos and incubated either in the absence or presence of 10 ng/ml of human recombinant activin A in LCMR for 6 hours (Stewart and Gerhart, 1990). The explants were then cultured in MSS until the control embryos reached stage 20.

Construction of *cpg* mutants

cpg-GFP was constructed as follows: the coding site of *cpg* was PCR-amplified with the primers GFP-UP 5'-CTTGAATTCCCAGGTGAAGATGGCAAGCTC-3' and GFP-DOWN 5'-CATTCTAGATGAAGCGTCCAAAACCCCCTC-3'. The PCR product

was cloned into pCS2mt-UGP digested with *Eco*RI and *Xba*I.

RESULTS

Isolation and characterization of *cpg*

champignon (*cpg*) was isolated by the expression screening of the cDNA library of stage 7 embryos as a gene that caused gross change in morphogenetic movement when microinjected into both cells of 2-cell stage *Xenopus* embryos. *cpg* encoded a putative protein of 470 amino acids with a predicted molecular mass of 52.6 kDa. The length of the *cpg* transcript was about 2.4 kb pairs as shown by northern hybridization (data not shown). *cpg* contains an N-terminal POZ domain and three C-terminal krüppel-like zinc finger domains of the C₂H₂ type (GenBank accession number AB029074) suggesting that *cpg* is a transcription factor. According to a search using PSORT, *cpg* has three putative nuclear localization signals (Fig. 1A). The homology search with the protein database by BLAST Search revealed that *cpg* is partially homologous to the transcription factors human c-krox (hc-krox; Widom et al., 1997) and mouse c-krox (mc-krox; Galera et al., 1994). The hc-krox contains a complete POZ domain and three zinc finger domains, while the mc-krox lacks most of the POZ domain. High identity of the amino acid sequences was found especially in the POZ domain and three zinc finger domains: the POZ domain of *cpg* was 63.5% identical to that of, and the zinc finger domains of *cpg* were 93.5% identical to those of human and mouse c-krox (Fig. 1A). The region between the POZ domain and zinc finger domains of *cpg* was shorter than those of human and mouse c-krox, and had low amino acid sequence identity with them. The other krüppel-like transcription factors, such as human AMP-1 and mouse LRF, had some identities with *cpg* in the zinc finger domains (Fig. 1B), but the identities in N-terminal region, including the POZ domain, were low.

The transcripts of *cpg* were present maternally, decreased gradually until the mid-blastula stage. Zygotic transcripts of *cpg* were increased gradually after the early gastrula stage (Fig. 2A). Since we could not detect regional differences in *cpg*

expression by whole mount in situ hybridization (data not shown) because of very low expression until the late gastrula stage, we examined the regional differences by quantitative RT-PCR in dissected embryos at the blastula (st. 8) and gastrula stages (st. 10). The quantity of *cpg* transcripts did not differ among the various region in blastula and gastrula embryos (Fig. 2B). Whole mount in situ hybridization of neurula embryos showed that *cpg* was expressed in the anterior region, especially in the cement gland precursor region (Figs. 2C,D). The strong expression continued to be localized at the cement gland after the tailbud stages (Figs. 2E,F).

Overexpression of *cpg* leads to defective gastrulation

One ng of synthetic *cpg* mRNA was injected into the lateral equatorial regions of the two blastomeres of the 2-cell embryo, and the vegetal regions of the injected embryos were observed by time-lapse videomicrography. The blastopore of the injected embryos appeared precisely on the dorsal side at the initial gastrula stage (st. 10), spread laterally, and formed a large yolk plug (data not shown). In most cases, however, the blastopore did not close thereafter (Fig. 4B) and conversely, the lateral regions of the blastopore disappeared (Fig. 3E). The injected embryos became mushroom-like-shaped in the most severely defective case at the neurula stage (Figs. 3E,4C). After the neurula stage the injected embryos elongated along the initial dorso-ventral axis gradually until the tailbud stages. The injected embryos looked like double layers of ectodermal and exposed endodermal cells externally at the tailbud stage (Fig. 3F). Most of the embryos injected with *cpg* mRNA at low doses invaginated slightly (Fig. 3C) and formed partial axial structures, including the head region (Fig. 3D, Table 1), but the blastopores remained open (Fig. 3D). These effects of *cpg* on gastrulation were thus dose dependent.

Animal or vegetal injections of *cpg* mRNA at the 2-cell stage gave less defective phenotypes than equatorial injection (Table 2). Embryos injected with *cpg* mRNA into the two dorsal blastomeres at the 4-cell stage gave rise to severely defective embryos

(Figs. 3G,H). However, embryos injected into the two ventral blastomeres of the 4-cell stage embryos developed relatively normally. In these ventrally injected embryos, gastrulation of the dorsal half was not affected at all and the anterior half of the resulting embryo was quite normal at the tailbud stage (Figs. 3I,J). These results indicate that the effects of *cpg* on the gastrulation movement were restricted to the area near the injected site and the overexpression at the dorsal marginal zone was most effective.

Morphogenesis of the *cpg*-injected embryos

Overexpression of *cpg* mRNA had no apparent effect on the cell division and cell proliferation at any of the developmental stages examined (Fig. 3,4). The injected embryos developed normally until the formation of the large yolk plug (stage 10.5), but the archenteron did not invaginate afterwards (Fig. 4B). The deep mesoderm seemed to migrate as a mass toward the animal pole after the gastrula stage (Figs. 4B,C). The blastocoelic cavity was reduced gradually during the neurula stage, and the blastocoelic fluid was absorbed into the intercellular spaces in the endodermal mass (Figs. 4C,5C). The *cpg* injected embryos differentiated neural tubes, notochords and somites at the site where the blastopore first appeared (Fig. 4D). To confirm tissue differentiation in *cpg*-injected embryos, we assayed the expression of various molecular marker genes by RT-PCR. The expression of early mesodermal (*Xbra*, *gooseoid*, *noggin*, and *Xwnt-8*) and mesendodermal (*siamois*) marker genes was not changed at the gastrula stage by the overexpression of *cpg* (Fig. 4E). At the late neurula stage, expression of late neural (*N-CAM* and *Otx-2*) and late mesodermal (*MyoD* and *GATA-2*) marker genes was also unchanged (Fig. 4F). These results show that the defect of gastrulation movements is not due to the lack of mesodermal differentiation.

In order to investigate the morphogenesis of *cpg*-injected embryos in detail we have observed the fine structure of the *cpg*-injected embryos by scanning electron microscopy. The lateral surface region of the ectodermal layer of the *cpg*-injected embryo was thin, but

the ectodermal layer near the animal pole remained thick during the gastrula stage (Figs. 5A,B). The epiboly of the animal pole seemed to be interfered with during the gastrula stage, but the ectodermal layer of the animal pole became thin after the neurula stage (Fig. 4C), even if the effect of *cpg* was maintained by the injection of the expression vector (pCS2+) including cDNA of *cpg* (data not shown). Migration of the mesoderm toward the animal pole was observed in *cpg*-injected embryos. However, the boundary between the ectodermal layer and migrating mesodermal cells was not clear until the late gastrula stage (Fig. 5B). The endodermal cells were scattered and the blastocoelic fluid filled the opening in the endodermal mass (Fig. 5C). We sometimes observed by time lapse videomicrography that the blastocoelic fluid flowed from the tear at the vegetal surface. Normal-shaped bottle cells were observed at the blastopore of the *cpg*-injected embryos (Fig. 5D). Therefore, formation of the bottle cells and migration of the deep mesodermal mass were not inhibited, but epibolic expansion of the animal hemisphere was temporarily inhibited by the overexpression of *cpg*. In order to investigate the morphogenetic movements further, we next examined the convergent extension movement in *cpg*-injected embryos.

***cpg* interferes with convergent extension movements**

As Keller sandwich explants are known to show convergent and extension movement autonomously (Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988), we observed the movements of Keller sandwich explants taken from *cpg*-injected embryos. The Keller sandwich explants from normal embryos elongated and mimicked convergent extension movements (Fig. 6A). However, elongation of the sandwich explants from *cpg*-injected embryos was interfered with considerably (Fig. 6B). To further test the effects of *cpg* expression on the convergent extension, we also assayed the animal cap explants. When the animal cap explants from normal embryos were treated with high doses of activin, they elongated and differentiated various tissues in a dose-dependent manner (Fig. 6C)

(Symes and Smith, 1987; Symes et al., 1994). Overexpression of *cpg* inhibited the elongation of the activin-treated animal cap almost completely (Fig. 6D). This was not due to the failure of mesoderm differentiation, because the activin-treated animal cap explants from *cpg*-injected embryos expressed mesodermal marker genes (*Xbra*, *noggin* and *MyoD*) at the same level as those from normal embryos (Fig. 6G: lanes 2,4). Without activin treatment, the animal cap explants from *cpg*-injected embryos neither elongated nor differentiated any mesodermal tissues, and formed spherical masses similar to those from control embryos (Figs. 6E,F). These results indicate that overexpression of *cpg* inhibits convergent extension movement. Molecular analysis of the animal cap explants showed that the expression of the mesodermal marker genes was not induced by the overexpression of *cpg* alone (Fig. 6G: lane 5). We also assayed the expression of molecular marker genes which are known to be related to convergent extension movement in *cpg*-injected embryos by RT-PCR during gastrulation: expression of *C-cadherin* (Lee and Gumbiner, 1995; Zhong et al., 1999) and *PAPC* (Kim et al., 1998) was not affected by the overexpression of *cpg* (Fig. 6H).

***cpg* acts like a transcriptional repressor**

As shown above, *cpg* encodes an N-terminal POZ domain and three C-terminal krüppel-like zinc finger domains of the C₂H₂ type and three putative nuclear localization signals. To determine whether *cpg* functions as a transcription factor, we first made a *cpg-GFP* construct and examined its localization in early embryos. A total of 1 ng of *cpg-GFP* mRNA was injected into the lateral equatorial regions of the two blastomeres of a 2-cell embryo and the injected embryos were observed later by fluorescence microscopy. The fluorescence was detected ubiquitously in the cytoplasm before the mid-blastula stage (Figs. 7A,B). However, the fluorescence began to localize into the nuclei after the late blastula stage (Figs. 7C,D). This result suggests that *cpg* acts as a zygotic transcription factor after the mid-blastula transition.

The POZ domain is an evolutionarily conserved protein-protein interaction domain (Bardwell and Treisman, 1994) required for both transcriptional activation and repression (Kaplan and Calame, 1997). As shown above, *cpg* is highly homologous to *hc-krox*, especially in the POZ and zinc finger domains. Since *hc-krox* is a transcriptional repressor of the *fibronectin* and *type I collagen alpha 1 (COL1A1)* genes (Widom et al., 1997), we expected that *cpg* would also control these target genes. Therefore, we assayed the expression of *fibronectin* and *Xenopus COL1A1* in *cpg*-injected embryos by RT-PCR. Neither injection of *cpg*-mRNA nor of pCS2+ vector including cDNA of *cpg* affected the expression of *fibronectin* at the gastrula stage (Fig. 8A) or the tailbud stage (data not shown) respectively. As the expression of *Xenopus COL1A1* is very low until the late neurula stage (Goto et al., unpublished), we assayed the level of *Xenopus COL1A1* expression at the tailbud stage by injection of pCS2+ vector including the cDNA of *cpg*. Overexpression of *cpg* remarkably repressed the expression of *Xenopus COL1A1* (Fig. 8B).

DISCUSSION

Role of *cpg* in the morphogenetic movements

Gastrulation movements involve the following four cellular processes: epiboly of the animal cap, formation of the bottle cells, migration of the deep mesoderm, and convergent extension of the marginal cells. (Keller, 1980; Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Hardin and Keller, 1988; Keller and Tibbetts, 1989; Wilson and Keller, 1991; Keller et al, 1992; Keller and Jansa, 1992; Shih and Keller, 1992a, b). Among these movements convergent extension plays the most essential role in gastrulation, because closure of the blastopore takes place even if the migration of the mesoderm does not occur, bottle cells after their formation are removed, or the animal cap is removed (Keller, 1981; Keller and Jansa, 1992). In *cpg*-injected embryos, migration of the mesoderm and bottle cell formation occurred, epiboly of the animal cap was temporarily inhibited, and convergent extension movements were inhibited. Further, convergent extension of the Keller sandwich and the animal cap explants treated with high doses of activin was inhibited in the *cpg*-injected embryos. These results suggest that the defect of gastrulation by *cpg* is mainly due to interference with the convergent extension movements. Expression of mesodermal marker genes was normal in *cpg* injected embryos and animal cap explants treated with activin. These results indicate that *cpg* does not affect the differentiation of mesoderm, but specifically affects the cellular movement of convergent extension. The convergent extension movements are the outcome of the cell intercalation which is the rearrangement of the cells within a cell layer and between the cell layers (Keller, 1980; Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Hardin and Keller, 1988; Keller and Tibbetts, 1989; Wilson and Keller, 1991; Keller and Jansa, 1992; Keller et al, 1992; Shih and Keller, 1992a, b). The rearrangement of the cells seems to require both changes of the cell shape, including the morphogenesis of the cytoskeleton, and the intermittent adhesion between the adjacent cells with or without the

extracellular matrix. If the defect of gastrulation is due to the change of the morphogenesis of the cytoskeleton, the cell division and proliferation during the early cleavage stage must be affected. However, the cell division and proliferation were not affected in *cpg*-injected embryos. This suggests that *cpg* affects the cell-cell adhesion or cell-substratum adhesion. Zhong et al. (1999) demonstrated that both decrease and increase of *C-cadherin* mediated cell-cell adhesion interfere with the convergent extension movements. Although the expression of *C-cadherin* and *PAPC* was not affected by *cpg*, *cpg* seems to be a transcription factor which controls the expression of other genes required for the intermittent adhesion during gastrulation.

Expression of *cpg*

The transcripts of *cpg* were present maternally, but the function of *cpg* before gastrulation is unknown since the embryos injected at the 2-cell stage developed normally until gastrulation. The nuclear localization of *cpg*-GFP protein was detected after the mid-blastula transition. Injection of the expression vector (pCS2+) including cDNA of *cpg* also caused the defect of gastrulation, and the phenotype of DNA-injected embryos was similar to that of mRNA-injected embryos (data not shown). Therefore *cpg* may function zygotically to inhibit the convergent extension movements. After the neurula stage the transcripts of *cpg* were increased and localized to the anterior region, especially in the cement gland. This suggests that *cpg* is related to the differentiation at the later developmental stages. We need to examine the function of *cpg* after gastrulation in detail.

Although convergent extension movements began at the dorsal marginal zone at the gastrula stages, the transcripts of *cpg* were present ubiquitously at the gastrula stages. The fluorescence signals of *cpg*-GFP began to localize into the nuclei after the mid-blastula transition. These results suggest that *cpg* requires co-factors which are expressed on the dorsal marginal zone after the mid-blastula transition. This is

supported by the reports that POZ family genes have some co-factors and regulate the transcription of target genes with their co-factors (Kaplan and Calame, 1997; Dhordain et al., 1998; Ahmad et al., 1998).

***cpg* is a novel transcriptional repressor**

Comparison of the predicted amino acid sequence of *cpg* with the protein database revealed that *cpg* is most homologous to the transcription factors human c-krox (Widom et al., 1997) and mouse c-krox (Galera et al., 1994), which contain POZ and zinc finger domains. The amino acid sequences of the POZ and zinc finger domains were highly conserved between *cpg* and these proteins. However, the region between the POZ domain and zinc finger domains of *cpg* was shorter than those of hc-krox and mc-krox and showed no obvious homology with them. Accordingly, we conclude that *cpg* is not a *Xenopus* homologue of *hc-krox* and *mc-krox*, but a new member of the c-krox family of genes. Nevertheless, remarkably high identities in the three zinc finger domains at the C-terminus with human and mouse c-krox suggest that the target genes of *cpg* may be similar to those of *hc-krox* and *mc-krox*. It has been reported that the target genes of *hc-krox* and *mc-krox* were fibrous proteins which constitute the extracellular matrix.

Although *hc-krox* represses the transcription of human *COL1A1* and *fibronectin* (Widom et al., 1997), *mc-krox* activates the transcription of mouse *COL1A1* and *COL1A2* (Galera et al., 1994; Galera et al., 1996). The main difference in amino acid sequence between hc-krox and mc-krox is the length of the POZ domain at the N-terminus. The POZ domain, also known as BTB, is an evolutionarily conserved protein-protein interaction domain and is found at the N terminus of 5-10% of the C₂H₂ type zinc finger transcription factors (Bardwell and Treisman, 1994). This domain is strongly implicated in the regulation of gene expression through the local control of chromatin conformation (Albagli et al., 1995). Most of the transcription factors containing the POZ domain are reported to be repressors (Dhordain et al., 1998; Ahmad et al., 1998), but some of the

POZ/zinc finger transcription factors are activators. The POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression (Kaplan and Calame, 1997). Our data indicate that *cpg* contains a full-length N-terminus POZ domain which is highly homologous to that of *hc-krox*. Actually, *cpg* repressed the expression of *Xenopus COL1A1* at the tailbud stage. These data suggest that *cpg* is a novel transcriptional repressor whose functional domain is most similar to that of *hc-krox*.

The target genes of *cpg*

As mentioned above, *cpg* is most similar to *hc-krox*, which is known to be a transcriptional repressor of *fibronectin* and *type I collagen*. However, we can not explain the phenotype of *cpg*-injected embryos by the repression of these genes. Although fibronectin is known to play a role in the migration of the mesoderm (Nakatsuji, 1986; Winklbauer, 1990; Ramos and DeSimone, 1996; Ramos et al., 1996; Winklbauer and Keller, 1996), the mesoderm migration was not inhibited in *cpg*-injected embryos. Although the defect of gastrulation caused by *cpg* is mainly due to interference with the convergent extension movements, the convergent extension movements were not affected by fibronectin (Keller and Jansa, 1992; Smith et al., 1990). Further, *Xenopus* embryos contain high levels of maternal *fibronectin* transcripts, and zygotic transcription begins only after the late gastrula stage (st. 12), while a large amount of zygotic *fibronectin* transcription occurs much later (Lee et al., 1984; DeSimone et al., 1992). Actually, our data indicated that the level of *fibronectin* transcripts was unchanged in *cpg*-injected embryos at the gastrula and the tailbud stages (data not shown). Therefore, the defect of gastrulation caused by *cpg* may not be related to *fibronectin* function.

Similarly, although our data indicated that *Xenopus COL1A1* seems to be a target gene of *cpg*, and the expression patterns of both genes are complementary (Goto et al., unpublished) at the tailbud stage, the defect of gastrulation caused by *cpg* may not be related to *Xenopus COL1A1* during gastrulation because the quantity of *Xenopus*

COL1A1 transcripts was very small during gastrulation (Goto et al., unpublished) and co-injection of *cpg* mRNA with *Xenopus COL1A1* mRNA did not rescue the defect of convergent extension movements caused by *cpg* (data not shown). Furthermore, although *C-cadherin* (Lee and Gumbiner, 1995; Zhong et al., 1999) and *PAPC* (Kim et al., 1998) are known to affect the convergent extension movements during gastrulation, *cpg* did not change the level of expression of either of these genes. Since it has been reported that human *c-krox* binds to the 5'-flanking region of the human *biglycan* gene in addition to the *fibronectin* and *COL1A1* genes (Heegaard et al., 1997), it is possible that *cpg* affects other unknown genes which control the convergent extension movements during gastrulation. Recently a new zinc finger gene with the POZ domain *OCZF* was isolated, and this gene was shown to bind to the *hc-krox*-binding consensus sequence (Kukita et al., 1999). Further, it was reported that POZ/zinc finger proteins may function as homo- and heterodimeric complexes (Li et al., 1997; Ahmad et al., 1998; Davies et al., 1999). These findings suggest that there may be other zinc finger proteins which control the common target gene of *cpg*. Isolation of the target genes, co-factors of *cpg*, and the other *cpg*-like POZ/zinc finger genes will be necessary to clarify the mechanism of gastrulation movements.

We thank Dr Hashimoto for advice and plasmids. We are very grateful to Dr Eto of the Central Research Laboratory, Ajinomoto Co. for human recombinant activin A. We also thank Dr Klymkowsky for providing pCS2mt-UGP.

REFERENCES

- Ahmad, K. F., Engel, C. K. and Prive, G. G. (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA* **95**, 12123-12128.
- Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G. and Leprince, D. (1995). The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* **6**, 1193-1198.
- Bardwell, V. J. and Treisman, R. (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* **8**, 1664-1677.
- Boucaut, J. C., Darribere, T., Poole, T. J., Aoyama, H., Yamada, K. M. and Thiery, J. P. (1984). Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: a competitive peptide inhibitor of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. *J. Cell Biol.* **99**, 1822-1830.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Davies, J. M., Hawe, N., Kabarowski, J., Huang, Q. H., Zhu, J., Brand, N. J., Leprince, D., Dhordain, P., Cook, M., Morriss-Kay, G. and Zelent, A. (1999). Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a potential target of the LAZ-3/BCL-6 oncogene. *Oncogene* **18**, 365-375.
- DeSimone, D. W., Norton, P. A. and Hynes, R. O. (1992). Identification and characterization of alternatively spliced fibronectin mRNAs expressed in early *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **149**, 357-369.
- Dhordain, P., Lin, R. J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., Evans, R. M. and Albagli, O. (1998). The LAZ3 (BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional

repression. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4645-4651.

Galera, P., Musso, M., Ducy, P. and Karsenty, G. (1994). c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA* **91**, 9372-9376.

Galera, P., Park, R. W., Ducy, P., Mattei, M. G. and Karsenty, G. (1996). c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 21331-21339.

Hadeball, B., Borchers, A. and Wedlich, D. (1998). Xenopus cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal. *Mech. Dev.* **72**, 101-113.

Hardin, J. and Keller, R. (1988). The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* **103**, 211-230.

Harland, R. (1991). In situ hybridization: an improved method for *Xenopus* embryos. In *Methods in Cell Biology*, vol. 36 (ed. Kay, B.K. and Peng, H.B.), pp. 685-695. San Diago: Academic press, Inc.

Heegaard, A. M., Gehron Robey, P., Vogel, W., Just, W., Widom, R. L., Scholler, J., Fisher, L. W. and Young, M. F. (1997). Functional characterization of the human biglycan 5'-flanking DNA and binding of the transcription factor c-Krox. *J. Bone. Miner. Res.* **12**, 2050-2060.

Kaplan, J. and Calame, K. (1997). The ZIN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1108-1116.

Keller, R. E. (1980). The cellular basis of epiboly: an SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **60**, 201-234.

Keller, R. E. (1981). An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in gastrulation of *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* **216**, 81-101.

Keller, R. E., Danilchik, M., Gimlich, R., Shih, J. (1985). The function and

mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **89 Supplement**, 185-209.

Keller, R. and Danilchik, M. (1988). Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* **103**, 193-209.

Keller, R. and Tibbetts, P. (1989). Mediolateral cell intercalation in the dorsal, axial mesoderm of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **131**, 539-549.

Keller, R. (1991). Early embryonic development of *Xenopus laevis*. In *Methods in Cell Biology*, vol. 36 (ed. Kay, B.K. and Peng, H.B.), pp. 61-113. San Diego: Academic press, Inc.

Keller, R. and Jansa, S. (1992). *Xenopus* Gastrulation without a blastocoel roof. *Dev. Dyn.* **195**, 162-176.

Keller, R., Shih, J. and Domingo, C. (1992). The patterning and functioning of protrusive activity during convergence and extension of the *Xenopus* organiser. *Development Supplement*, 81-91.

Kim, S. H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E. and De Robertis, E. M. (1998). The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* **125**, 4681-4690.

Kukita, A., Kukita, S., Ouchida, M., Maeda, H., Yatsuki, H. and Kohashi, O. (1999). Osteoclast-derived zinc finger (OCZF) protein with POZ domain, a possible transcriptional repressor, is involved in osteoclastogenesis. *Blood* **94**, 1987-1997.

Lee, G., Hynes, R. and Kirschner, M. (1984). Temporal and spatial regulation of fibronectin in early *Xenopus* development. *Cell* **36**, 729-740.

Lee, C. H. and Gumbiner, B. M. (1995). Disruption of gastrulation movements in *Xenopus* by a dominant-negative mutant for C-cadherin. *Dev. Biol.* **171**, 363-373.

Li, X., Lopez-Guisa, J. M., Ninan, N., Weiner, E. J., Rauscher, F. J. 3rd.

- and Marmorstein, R.** (1997). Overexpression, purification, characterization, and crystallization of the BTB/POZ domain from the PLZF oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **272**, 27324-27329.
- Nakatsuji, N.** (1986). Presumptive mesoderm cells from *Xenopus laevis* gastrulae attach to and migrate on substrata coated with fibronectin or laminin. *J. Cell SCI.* **86**, 109-118.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J.** (1967). Normal table of *Xenopus laevis*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- Okayama, H., Kawaichi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokota, T. and Arai, K.** (1987). High-efficiency cloning of full-length cDNA; construction and screening of cDNA expression libraries for mammalian cells. *Methods Enzymol.* **154**, 3-28.
- Ramos, J. W. and DeSimone, D. W.** (1996). *Xenopus* embryonic cell adhesion to fibronectin: position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation. *J. Cell Biol.* **134**, 227-240.
- Ramos, J. W., Whittaker, C. A. and DeSimone, D. W.** (1996). Integrin-dependent adhesive activity is spatially controlled by inductive signals at gastrulation. *Development* **122**, 2873-2883.
- Shih, J. and Keller, R.** (1992a). Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 901-914.
- Shih, J. and Keller, R.** (1992b). Patterns of cell motility in the organizer and dorsal mesoderm of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 915-930.
- Smith, J. C., Symes, K., Hynes, R. O. and DeSimone, D.** (1990). Mesoderm induction and the control of gastrulation in *Xenopus laevis*: the roles of fibronectin and integrins. *Development* **108**, 229-238.
- Stewart, R. M. and Gerhart, J. C.** (1990). The anterior extent of dorsal development of the *Xenopus* embryonic axis depends on the quantity of organizer in the late blastula. *Development* **109**, 363-372.

- Symes, K. and Smith, J. C.** (1987). Gastrulation movements provide an early marker of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Development* **101**, 339-349.
- Symes, K., Yordan, C. and Mercola, M.** (1994). Morphological differences in *Xenopus* embryonic mesodermal cells are specified as an early response to distinct threshold concentrations of activin. *Development* **120**, 2339-2346.
- Wallingford, J. B., Sater, A. K., Uzman, J. A. and Danilchik, M. V.** (1997). Inhibition of morphogenetic movement during *Xenopus* gastrulation by injected sulfatase: implications for anteroposterior and dorsoventral axis formation. *Dev. Biol.* **187**, 224-235.
- Widom, R. L., Culic, I., Lee, J. Y. and Korn, J. H.** (1997). Cloning and characterization of hcKrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression. *Gene* **198**, 407-420.
- Wilson, P. and Keller, R.** (1991). Cell rearrangement during gastrulation of *Xenopus*: direct observation of cultured explants. *Development* **112**, 289-300.
- Winklbauer, R.** (1990). Mesodermal cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Dev. Biol.* **142**, 155-168.
- Winklbauer, R. and Keller, R. E.** (1996). Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **177**, 413-426.
- Zhong, Y., Brieher, W. M. and Gumbiner, B. M.** (1999). Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J. Cell Biol.* **144**, 351-359.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. (A) Alignment of the *cpg*, human c-krox, and mouse c-krox amino acid sequences. The amino acid residues that are identical between the proteins are shaded gray. The putative nuclear localization signals identified using PSORT are boxed. The POZ domain at the N-terminus is indicated by an interrupted underline. The zinc finger domains at the C-terminus are underlined. (B) Homology of zinc finger domains of *cpg* to those of other krüppel-like zinc finger proteins. The zinc finger domains are boxed. Asterisks indicate the cysteines and histidines of zinc fingers.

Fig. 2. Temporal and spatial expression of *cpg* during *Xenopus* development. (A) Quantitative RT-PCR was performed using 1 μ g of total RNA extracted from *Xenopus* embryos at different stages. Oo indicates the oocyte stage and numbers indicate the developmental stages. Maternal transcripts decreased gradually until the midblastula stage (st. 8), and zygotic expression increased after the initial gastrula stage (st. 10). (B) Quantitative RT-PCR to determine spatial expression was performed using total RNA extracted from different dissections of embryos at the midblastula stage (st. 8) and the initial gastrula stage (st. 10). *cpg* was expressed ubiquitously during these stages. (C-F) Localization of *cpg* transcripts in *Xenopus* embryos after the neurula stage by whole mount in situ hybridization. At the neurula stage (st. 16) *cpg* was expressed in the cement gland precursor region in C (ventral view) and D (anterior view). After the tailbud stage *cpg* was expressed in the anterior region especially in the cement gland (arrowheads) in E and F.

Fig. 3. Overexpression of *cpg* interfered with gastrulation. (A, C, E, G, I) Neurula stage embryos (st. 20). (B, D, F, H, J) Tailbud stage embryos (st. 30). (A, C, E) Upper: lateral view, anterior to the left. Lower: blastopore view. (G, I) Left: lateral

view, anterior to the left. Right: blastopore view. *cpg* mRNA (1 ng) was injected into the lateral equatorial regions of the 2-cell embryo (C-F). *cpg* mRNA (1 ng) was injected into two dorsal (G, H) or two ventral (I, J) equatorial regions of the 4-cell embryo. (A, B) Control embryos. (C, D) Embryos showing slightly defective phenotypes. Some of the injected embryos had a slightly opened blastopore in C and formed partial axial structures including the head region in D. (E, F) Embryos showing severely defective phenotypes. The blastopore of most of the injected embryos did not close but regressed during the neurula stage in E. The injected embryos elongated along the initial dorso-ventral axis gradually during tailbud and looked like flat layers of double sheets of the ectodermal and endodermal tissues in F. (G, H) The morphology of the embryos that were injected into two dorsal regions at the 4-cell stage was similar to that seen in E and F. (I, J) Only ventral gastrulation was inhibited by the overexpression of *cpg* in the ventral region.

Fig. 4. Midsagittal sections (A-D) and RT-PCR (E, F) of the *cpg*-injected embryos. *cpg* mRNA (1 ng) was injected into two lateral equatorial regions of the 2-cell embryo. (A) The control embryo (st. 11.5). (B) The *cpg*-injected embryo at st. 11.5. Initial invagination occurred (arrowhead), but gastrulation did not proceed afterwards. Although *cpg* overexpression interfered with invagination, the inner deep mesoderm migrated as a mass. The border between the ectodermal layer and migrating inner cells was not clear. (C) The *cpg*-injected embryo at st. 20 looks like a mushroom. The blastocoelic cavity has disappeared and the three germ layers are clearly defined. (D) The *cpg*-injected embryo at st. 30. Neural tube (Ne) and notochord (No) are shown apparently at the site where the blastopore first appeared. (E, F) RT-PCR showed no significant effect of the overexpression of *cpg* on the expression of the early mesodermal (*Xbra*, *gooseoid*, *noggin* and *Xwnt-8*) and mesendodermal (*siamois*) marker genes at the gastrula stage (st. 11) in E, and the late neural (*N-CAM* and *Otx-2*) and mesodermal

(*MyoD* and *GATA-2*) marker genes at the late neurula stage (st. 23) in F.

Fig. 5. SEM images of *cpg*-injected embryos. *cpg* mRNA (1 ng) was injected into two lateral equatorial regions of the 2-cell embryo, which was then fixed at the mid gastrula stage (st. 11.5). (A) Epiboly of the animal cap was interfered with and the ectodermal layer of the animal pole was thick. (B) The ectodermal layer of the lateral region was thin and the inner mesoderm migrated toward the animal pole. (C) Endodermal cells were scattered and did not closely adhere to each other. (D) Normal-shaped bottle cells were formed.

Fig. 6. *cpg* inhibited extension of Keller sandwich explants and the animal cap explants treated with activin. (A) Keller sandwich explants from control embryos. (B) Keller sandwich explants from *cpg*-injected embryos. *cpg* mRNA (1 ng) was injected into two lateral equatorial regions of the 2-cell embryo. Dorsal sectors of the *cpg*-injected embryos were excised at stage 10 and sandwiched. Overexpression of *cpg* caused a defect of the elongation. (C) Animal cap explants from control embryos. The animal caps were excised from stage 8 embryos and incubated for 6 hours with recombinant activin protein (10 ng/ml) and cultured in MSS until control embryos reached st. 20. A high dose of activin induced elongation of the animal cap. (D) Animal cap explants from *cpg*-injected embryos. *cpg* mRNA (1 ng) was injected into the animal pole regions of both blastomeres at the 2-cell stage, then explanted at st.8, and treated with a high dose of activin (10 ng/ml) for 6 hours. *cpg* completely interfered with the elongation of the explants treated with a high dose of activin. (E) *cpg* alone did not induce any morphological changes and resulted in formation of spherical masses similar to those in F. (F) Control animal cap explants without any treatment. (G) RT-PCR of RNA extracted from the animal caps (st. 11) showed no significant effect of the overexpression of *cpg* on the expression of the mesodermal marker genes induced by

activin (*noggin*, *MyoD* and *Xbra*). (H) *cpg* mRNA (1 ng) was injected into the lateral equatorial region of the 2-cell embryo. RT-PCR showed no significant effect of the overexpression of *cpg* on the expression of genes (*C-cadherin* and *PAPC*) which are known to be related to the gastrulation movements.

Fig. 7. *cpg* was localized into the nuclei after the mid-blastula stage. (A-D) mRNA (1 ng) of *cpg-GFP* was injected into two lateral equatorial regions of the 2-cell embryo. (A) A *cpg-GFP*-injected embryo at st. 8. (B) The same embryo as A. Fluorescence of *cpg-GFP* was detected ubiquitously in the cytoplasm. (C) A *cpg*-injected embryo at st. 9. (D) The same embryo as C. *cpg-GFP* began to localize into the nuclei.

Fig. 8. Expression of *Xenopus fibronectin* and *Xenopus COL1A1* in *cpg*-injected embryos. *cpg* mRNA (for *fibronectin*) or the expression vector (pCS2+) including the cDNA of *cpg* (for *Xenopus COL1A1*) was injected into two lateral equatorial region of the 2-cell embryo. (A) Overexpression of *cpg* mRNA did not affect the expression of *fibronectin* at the gastrula stage (st. 11). (B) The expression of *Xenopus COL1A1* was remarkably repressed at the tailbud stage (st. 30).

Table 1. Dose dependent inhibition of gastrulation movements in *cpg* injected embryos. *cpg* mRNA (1 ng) or β -gal mRNA (1 ng) for control was injected into two lateral equatorial regions of the 2-cell embryo. The phenotype was scored at the tailbud stage. Injection of a low dose of *cpg* mRNA (250 pg) resulted in slightly defective phenotype of gastrulation. These embryos developed to partially defective embryos as shown in Fig. 3D at the tailbud stage. The injection of higher doses of *cpg* mRNA (≥ 500 pg) strongly interfered with gastrulation. These embryos developed to severely defective embryos as shown in Fig. 3F.

Table 2. Equatorial injections of *cpg* mRNA produced most severely defective embryos. *cpg* mRNA (1 ng) was injected into the animal pole, lateral equatorial, or vegetal pole regions of both blastomeres of the 2-cell embryo and the resulting phenotypes were scored at the tailbud stage. The injection into the lateral equatorial region most severely affected gastrulation movement. The phenotypes followed those of Table 1 and Fig. 3.

Table 1. The dose-dependent effects of *cpg* on gastrulation

injected RNA	Dose (/blastomeres)	severe defect of gastrulation (no head structure)	slight defect of gastrulation (posterior axis defect)	normal
cpg	1ng n=82	90%	9%	1%
	500pg n=92	87%	12%	1%
	250pg n=93	36%	47%	17%
β -gal	1ng	0%	0%	100%

Table 2. The injected site-dependent effects of *cpg* on gastrulation

	injected region	severe defect of gastrulation (no head structure)	slight defect of gastrulation (posterior axis defect)	normal
2-cell	animal n=124	23%	35%	42%
	marginal n=96	83%	17%	0%
	vegetal n=109	45%	32%	23%

A

```

cpg      MASSEDELIGIPFPEHSSDLLSSLNEQRHSGVLC DITIKTRGLEYP THRAVLAACSDYFR
hc-krox  MGSPEDDLIGIPFPDHSSELLSCLNEQRQLGHLCDLTIRTQGLE YRTHRAVLAACSHYFK

cpg      KMFT----G--M-P-GRG--K--C-PDVCOLDFLKPDALGALLDFAYTATLTISNGNMRD
hc-krox  KLFTEGGGGAVMGAGSGTATGGAGAGVCELD FVGPEALGALLEFAYTATLTSSANMPA
                                         MPA

cpg      VLRAARLLEIPCVVHACVDILQCNGHREEMGGDAEDLECFLRARQYLD SYMENGENA-TP
hc-krox  VLQAARLLEIPCVIAACMEILQGSG L-EAPSPD-ED-DC-ERARQYLEAFATA--TA--S
mc-krox  VLQAARLLEIPCVIAACMEILQGSG L-EAPSPD-ED-DC-ERARQYLEAFATATTTASTS

cpg      -PPEAESPPPHPHNIPVPPKSVQII PRRGRK--K FLQVNPNNRNQ-- --NG-NL-- --LR
hc-krox  GVPNGEDSPPQVPLPPPPPPPPRPVARRSRKPRKAFLQTKGARANHLVPEVPTVPAHPLT
mc-krox  GMPNGEDSPPQVPLLLPPPPPPPPRPVARRSRKPRKAFLQTKGARANHLVPEAPT VLTHTPLT

cpg      -GADDSLER-D--ASHA-G---SPP-- --NEPSLG YETYAQDNG-- --LGGHTIFVFP-S-P-
hc-krox  YEEEEVAGRVGSSGGSGPGDSYSPPTGTASPP EG PQSYEPYEGEEEEEEELVYPPAYGLAQ
mc-krox  YEEEEMVGR LGNSGGSGLGDSYSPPTGAASPT EG PLNYEVFE GEEEEEEEMAYPPGYGLAQ

cpg      PEE-ILSDEE-TSDMGFHN P---Y--DLENPVSAGLDVS-DKLVR RKRR SOLPQEC CPVCH
hc-krox  GGGPPLSP EELGSD EDAIDPDL MAYLSSLHQDN LAPGLDSQDKLVR RKRRS QMPQEC CPVCH
mc-krox  SNEPSLSPEELGSD EDPIDPDL MAYLSSLHQGRPDTRPGWQDKLVR RKRRS QMPQEC CPVCH

cpg      KIIHGAGKLPRHMRTH TGEKPFV COVCGVR FTRNDKLKIHM RKHTGERPYC CEHCSARFL
hc-krox  KIIHGAGKLPRHMRTH TGEKPFACEVCGVR FTRNDKLKIHM RKHTGERPYSCPHCPARFL
mc-krox  KIIHGAGKLPRHMRTH TGEKPFACEVCGVR FTRNDKLKIHM RKHTGERPYSCPHCPARFL

cpg      HSYDLKNHMH LHTGDRPFEC SLCHKAFAKEDHLQRHMKGQNCLEVRT RRRRK EEPTVPH-
hc-krox  HSYDLKNHMH LHTGDRPYECHLCHRAFAKEDHLQRHLKGQNCLEVRT RRRRKDD -APPHY
mc-krox  HSYDLKNHMH LHTGDRPYECHLCHKAFAKEDHLQRHLKGQNCLEVRT RRRRKDD VAAPHY

cpg      -----MHPA-LDLSNGK LDDVPLSMIRFW---G-IPVPRSGGGSPEGVLDAS
hc-krox  PPPSTAAAFPAGLDLSNGHLDTFRLSLARFWEQSAPT WAPVSTPGPPDDDEEGAPTTPQ
mc-krox  PPPSTTTSSPAGLDLSNGHLDTFHLSLARFWEQSATTGPPVTTQGPPEEEEEEGTPTTPQ

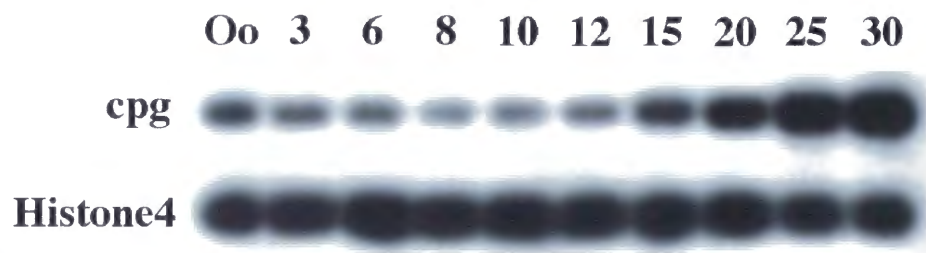
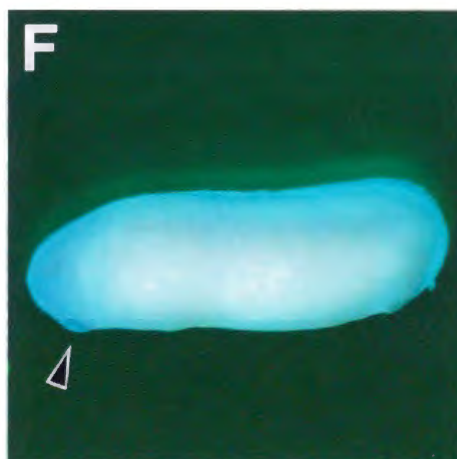
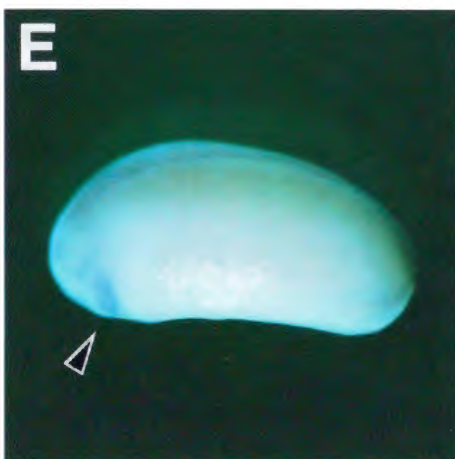
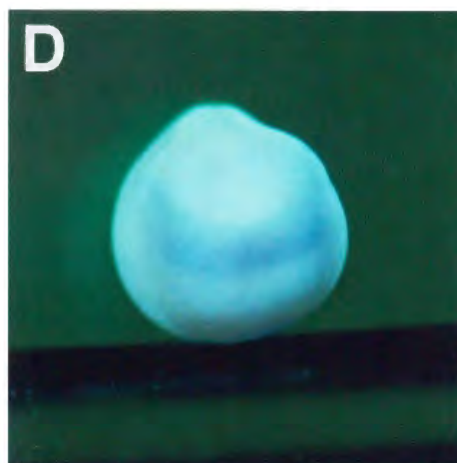
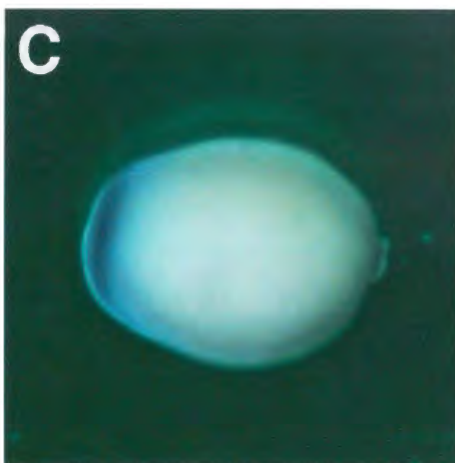
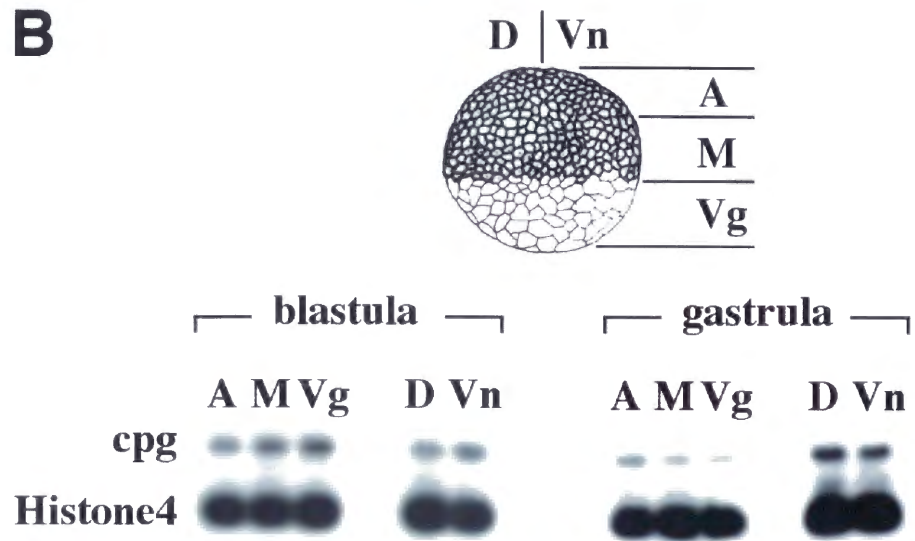
```

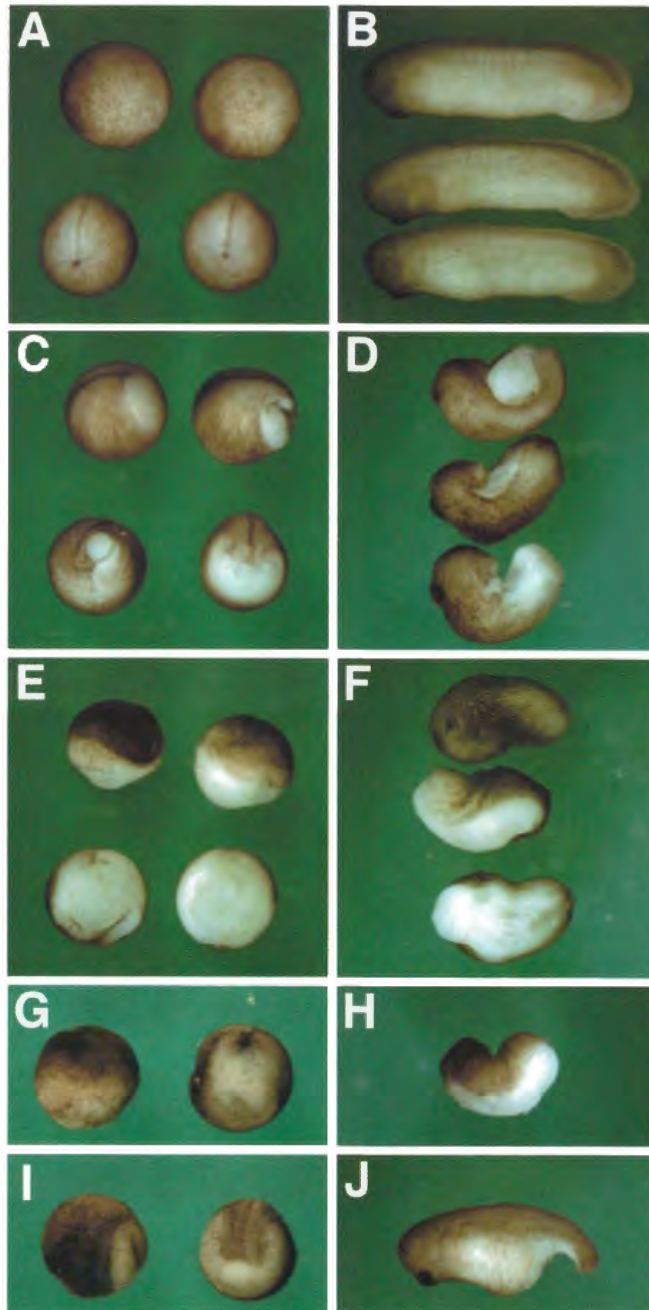
B

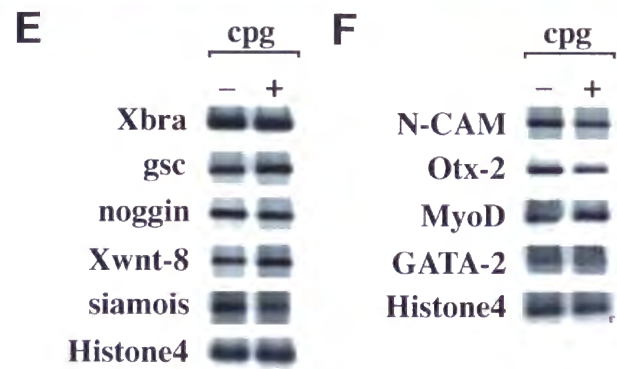
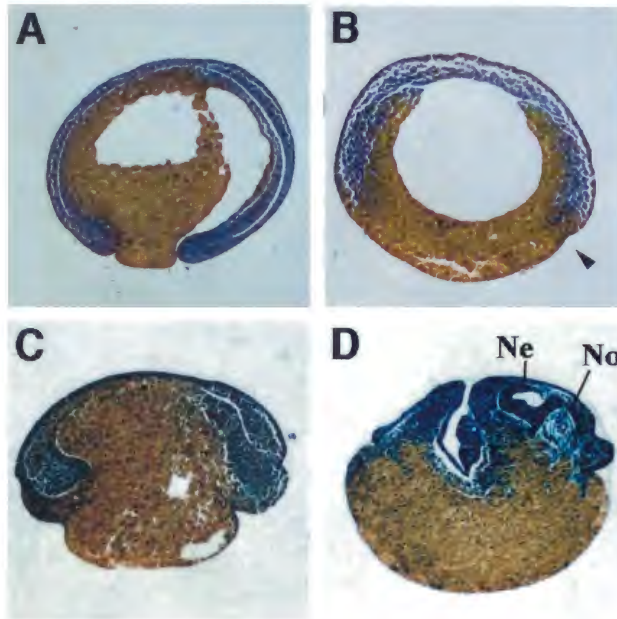
```

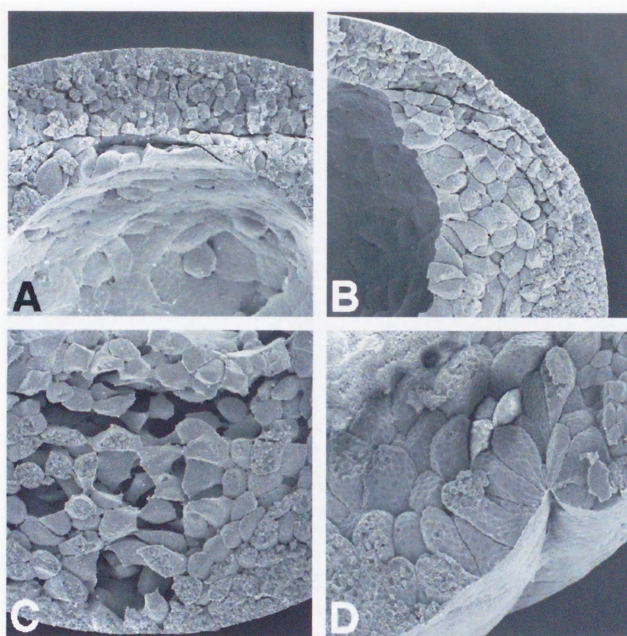
* * * * *
cpg      CPVCHKIIHGAGKLPRHMRTH TGEKPFV COVCGVR FTRNDKLKIHM RKHTGERPYC CEHCSARFLHSYDLKNHMH L
hc-krox  -----A-E-----S-P--P----- 93.5%
mc-krox  -----A-E-----S-P--P----- 93.5%
APM-1    --I--V-M-----YM-TI-E---Q-----L-I--N-K-V-N-----RI- 77.9%
OCZF     --I-E-V-Q-----I-----YE-NI-K---Q-----V-----K--L-QQ-G-A-A-N-----RV- 71.4%
mLRF     --I-E-V-Q-----I-----YE-NI-K---Q-----V-----K--L-QQ-G-A-A-N-----RV- 71.4%
gLRF     --I-A-V-Q-----I-----YE-NI-N---Q-----V-----K--L-QQ-G-A-A-N-----RV- 71.4%
Krüppel -KI-SRSFGYKHV-QN-E-----E-PE-DK---DHH--T---L---K--H-SH-DRQ-VQVAN-RR-LRV- 46.8%

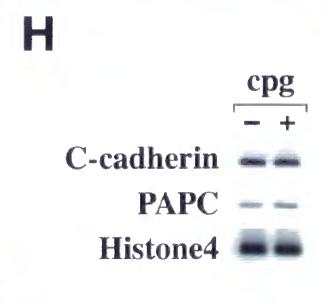
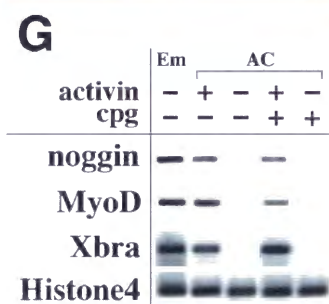
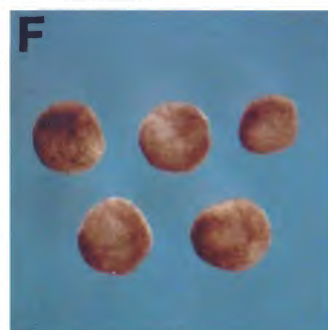
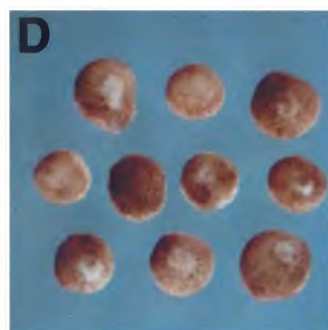
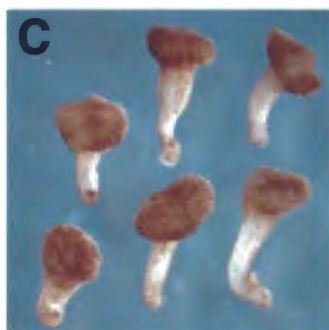
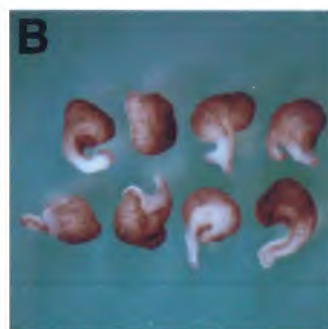
```

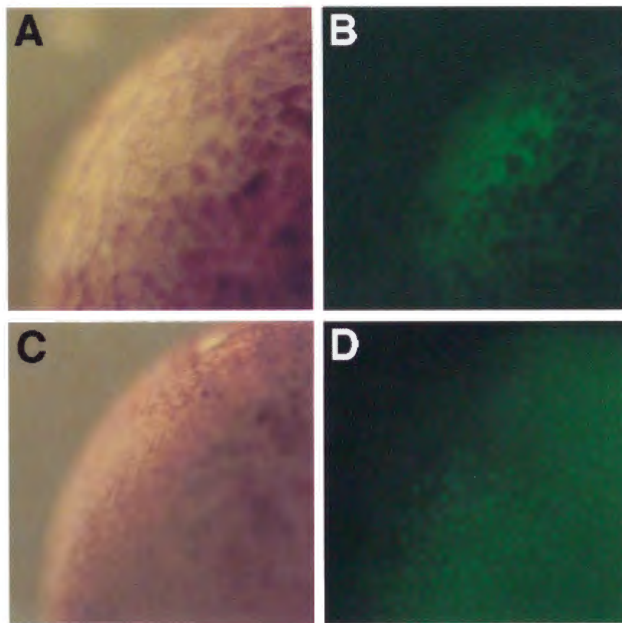
A**B**



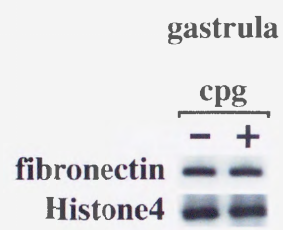








A



B

